

**Das solide Ehrlich's Ascites Carcinom
bei Mäusen**

**— Einfluß des Antifibrinolytikums AMCHA
auf Überlebenszeit, Gewichte und
fibrinolytische Aktivitäten
von Tumor und Lunge —**

Oswin Rupprecht

1981

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. Georg Heberer

Das solide Ehrlich's Ascites Carcinom bei
Mäusen

- Einfluss des Antifibrinolytikums
AMCHA auf Überlebenszeit, Gewichte
und fibrinolytische Aktivitäten
von Tumor und Lunge -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Oswin Rupprecht

aus

Ebermannstadt

Jahr

1979

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 5. 81



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für klinische Chemie der Universität München angefertigt.

Für die großzügige Förderung und insbesondere für die wertvollen Ratschläge und anregenden Diskussionen möchte ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. H. Fritz bedanken.

Ebenfalls gilt mein herzlicher Dank Herrn Dr. med. L. Qvick, der mich zu dieser Arbeit anregte und bei den experimentellen Untersuchungen anleitete.

Frau Dr. Jochum danke ich für die kritische Durchsicht.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

	Seite
1. Allgemeine Charakteristika eines Tumors	1
1.1. Begriffsbestimmungen und Definitionen	1
1.2. Ursachen und Entstehung des Tumors	2
1.3. Tumorimmunität	3
2. Spezielle Tumoreigenschaften	4
2.1. Thromboplastische Eigenschaften	4
2.2. Fibrinolytische Eigenschaften	7
3. Invasives Wachstum	10
4. Metastasierung	12
5. Bedeutung der speziellen Tumoreigenschaften für die Tumordiagnose	13
6. Therapie	14
6.1. Modelle zur Funktion des Fibrins in und um das Tumorgewebe	14
6.2. Antikoagulantien	16
6.3. Fibrinolytika	19
6.4. Antifibrinolytika	20
7. Begründung und Abgrenzung der Arbeit, Arbeitshypothese	23

II. Hauptteil

	Seite
1. Material und Methodik	28
1.1. Material	28
1.2. Methodik	29
1.2.1. Fibrinolysemessungen	31
1.2.2. Auswertung der Messergebnisse	33
2. Ergebnisse	35
2.1. Bestimmung der Überlebenszeit	35
2.2. Gewicht	37
2.3. Abhängigkeit der Überlebenszeit vom Gewicht	42
2.4. Metastasen	42
2.5. Tumorabhängige Komplikationen	45
2.6. Fibrinolyse	47
2.6.1. Fibrinolytische Aktivitäten der Gewebe in den verschiedenen Gruppen	47
2.6.1.1. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 1	50
2.6.1.2. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 2	50
2.6.1.3. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 3	52
2.6.1.4. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 4	53
2.6.1.5. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 5	53
3. Diskussion	56
3.1. Diskussion zur Methode	56
3.1.1. Tierversuche	56
3.1.2. Fibrinplattentest	57

	Seite
3.2. Diskussion der Ergebnisse	58
4. Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten und Interpretation	71 .
III. Zusammenfassung	76
IV. Literaturverzeichnis	79

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

AMCHA	= Aminomethylcyclohexancarboxylsäure
CCF	= Cancer coagulative factor
CEA	= kolonspezifisches karzinoembryonales Antigen
C-Zellen	= Carcinomzellen
DIC	= disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
EAC	= Ehrlich Ascites Karzinom
EACA	= Epsilonaminocaprinsäure
FDP	= Fibrinogenspaltprodukte
fl. A.	= fibrinolytische Aktivität
G.v.Inj.	= Gewicht vor der Injektion von Carcinomzellen
G TuM	= Gewicht der Tumormaus nach dem Tod
G Tu	= Gewicht des Tumors
dG M	= $G\ TuM - G\ Tu$
dG	= $G\ TuM - G.v.Inj.$
MG	= Molekulargewicht
i.v.	= intravenös
i.m.	= intramuskulär
i.p.	= intraperitoneal
n	= Stückzahl in einer Gruppe
ÜZ	= Überlebenszeit

I. Einleitung

1. Allgemeine Charakteristika eines Tumors

1.1. Begriffsbestimmungen und Definitionen

Ein Tumor hat folgende Eigenschaften: Er muß ein überschießendes Wachstum zeigen, sich gegenüber seiner Umgebung unkoordiniert verhalten und sein Wachstum muß unabhängig von Reizen sein. Ein benigner Tumor ist - im Gegensatz zum malignen Tumor - für den Tumorkranken von seinen Wachstumseigenschaften her harmlos. Er wächst durch Verdrängung des benachbarten Gewebes (expansives Wachstum) . Der maligne Tumor zeigt die Eigenschaften eines fortschreitenden und raschen Wachstums: Infiltration und Metastasierung. Die Zellen des bösartigen Tumors sind durch folgende Merkmale charakterisiert: Atypie der Zellkerne und des Zytoplasmas, verschobene Kern- Plasmarelation zugunsten des Kerns, Dedifferenzierung der Zellen und Zunahme der Malignität mit Zunahme der Dedifferenzierung. Die Metastasierung erfolgt über Lymphwege und Blutgefäße oder durch direkte Implantierung der Tumorzellen. Voraussetzung ist die Verschleppung von Geschwulstzellen und ihre Haftung. Tumorzellen haben die Eigenschaft über Jahre hinweg zu ruhen,

um dann plötzlich in eine Phase rapiden Wachstums überzugehen. Den Übergang in die rasche und unempfindlichere Wachstumsphase nennt man Tumorprogression. Spontane regressive Veränderungen bis hin zur Nekrose entstehen häufig im Zentrum der Tumoren oder der Metastasen infolge unzureichender Blutversorgung und Mangelerkennung des rasch wachsenden Tumors. Tumorregression kann auch die Folge einer zellulären Immunreaktion gegen die auf den Zelloberflächen befindlichen tumorspezifischen Transplantationsantigene sein. Die Einteilung der Tumoren erfolgt ihrer Herkunft nach in solche mesenchymalen Ursprungs (Sarkome), wie die Tumoren des Binde- und Fettgewebes, der Muskulatur, der Blut- und Lymphgefäße und in solche epithelialen Ursprungs (Karzinome).

1.2. Ursachen und Entstehung eines Tumors

Tumoren können aufgrund der vielfältigsten Ursachen entstehen, die man in Ursachengruppen zusammenfassen kann. Man unterscheidet danach äußere Einflüsse wie beispielsweise Strahlen oder Viren und innere Einflüsse wie Individual-, Organ- und Geschlechtsdisposition, erbliche Vorerkrankungen mit hohem Entartungsrisiko,

Hormone und immunologische Abwehrreaktionen.

Die Karzinogenese lässt sich in drei Phasen einteilen, die im folgenden nur kurz genannt werden: Initiierung, Latenzperiode und Phase der eigentlichen Geschwulstentstehung.

1.3. Tumormunität

Geschwulstzellen sind veränderte Zellen bezüglich ihrer Form, DNA, ihrer Wachstums- und anderer Eigenschaften. Die Vorstellung, daß die bösartigen Geschwülste aufgrund ihrer tumorspezifischen Transplantationsantigene als Fremdgewebe betrachtet werden, wurde tierexperimentell in Studien mit virusinduzierten Tumoren bestätigt. Das Auftreten von Fremdgewebe im Körper wird von diesem mit einer Immunreaktion beantwortet, die hauptsächlich über zelluläre Faktoren vermittelt wird. Tumorspezifische Antigene sind u.a. embryonale Antigene, die normalerweise während der Embryogenese, nicht aber im Erwachsenenalter nachweisbar sind. Das Alpha-1-Fetoprotein ist ein Alpha-1-Globulin und normalerweise während der zweiten bis sechsten Schwangerschaftswoche nachweisbar. Danach werden die Gene, die obengenanntes Protein determinieren, reprimiert. Bei malignen Zellen kann es zur Derepression dieser

Gene und damit zur erneuten Produktion von Antigenen kommen. Bei Spiegeln über 300 Mikrogramm pro Milliliter Serum gilt ein Hepatom, beziehungsweise ein Teratom als bewiesen. (Normwert: unter 30 Mikrogramm pro Milliliter).

Das kolonspezifische karzinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Glykoprotein und Bestandteil der Kolonzelle. Es erreicht insbesondere bei metastasierenden Adenokarzinomen des Kolons hohe Serumspiegel. Es spielt weniger für den Nachweis als für die Verlaufsbeurteilung eines Kolonkarzinoms eine Rolle, da es auch in der normalen Kolonzelle und bei anderen entzündlichen Erkrankungen, insbesondere des Magen-Darmtraktes vorkommt.

2. Spezielle Tumoreigenschaften

2.1. Thromboplastische Eigenschaften

Im extrazellulären Raum, in dem das Wachstum der Carcinomzellen stattfindet, herrscht eine geringere Proteinkonzentration als im Plasma. Da aber auch die transformierten Zellen makromolekulare Serumkomponenten für das Wachstum benötigen, ist es notwendig, daß die Plasmaproteine vermehrt ins extrazelluläre Milieu gelangen. Dies kann beispielsweise mit Hilfe humoraler Stoffe, die aus Zellen freigesetzt werden, vermittelt werden (19).

Einer dieser Stoffe könnte ein gerinnungsfördernder Faktor sein. Viele Untersucher konnten in tierischen und menschlichen Tumoren eine gegenüber der Umgebung und dem Ursprungsgewebe des Tumors erhöhte thromboplastische Aktivität nachweisen. O'Meara (47) gelang in seinen Untersuchungen der Nachweis der Freisetzung eines Faktors aus wachsenden Tumorzellen. Dieser Faktor, der aus dem Tumor in die umgebende Natriumchloridlösung diffundierte, war imstande in verdünntem Plasma die Gerinnung auszulösen. Er war sehr labil, so daß er innerhalb weniger Stunden nicht mehr nachweisbar war. Diesen Faktor, der nur im Tumorgewebe vorhanden war nannte er "Cancer Coagulative Factor" (CCF), der mit dem Gewebsthromboplastin (Faktor 3) identisch ist. Dieser Faktor 3 aktiviert Faktor VII der Blutgerinnung in Anwesenheit von Ca^{++} . Das aktivierte Faktor VII- Ca^{++} -Produkt seinerseits aktiviert Faktor X und Xa. Letzterer bildet mit Faktor V, Cephalin und Ca^{++} das aktivierte Thromboplastin (Thrombokinas). Durch die Abgabe des Faktors 3 aus den C-Zellen wird eine Fibrinpräzipitation ausgelöst, aus der sich ein Granulationsgewebe entwickelt, welches dem Tumor Wachstum und Invasion ermöglicht. Die allgemeinen Folgen der Fibrinpräzipitation sind leicht verständlich: Durch den

hohen Fibrinogenverbrauch wird die Leber veranlasst ihre Fibrinogenproduktion zu steigern, so daß der durchschnittliche Blutfibrinogenspiegel erhöht ist. Obiges Modell brachte O'Meara mit dem Befund einer starken Reduktion des Heparin-Co-Faktors bei malignen Erkrankungen in Zusammenhang: Er vertrat die Auffassung, der hohe Fibrinogenspiegel und der Mangel an Heparin-Co-Faktor begünstige die Bildung eines Gerinnsels um die Tumorzellen und fördere damit die Metastasierung. Weitere Befunde, die obiges Modell stützen, erbrachte E.Cliffton (18). Er fand, daß Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom merkliche Veränderungen in ihrem Gerinnungs- und Fibrinolyseverhalten zeigen. Durch die erhöhten Spiegel der Hemmstoffe sowohl von Plasminaktivatoren und Plasmin als auch anderer proteolytischer Enzyme war ihre Thromboseneigung stark erhöht. E. Cliffton und C. Grossi (24) stellten schon zu einem frühen Zeitpunkt im Wachstum transplantierter Tumoren fest, daß die Spiegel für Fibrinogen und für die Hemmung der Plasminaktivierung im Blut der Tiere im Experiment stark erhöht waren. H.I. Peterson (55) und H.I. Peterson et L. Zettergren (58) fanden, daß das Mammakarzinom der Maus eine sehr viel höhere thromboplastische Aktivität als irgendein anderes Gewebe einer normalen Maus aufweist. Allerdings

deutete H.I. Peterson (55) und andere Autoren (66) die Fibrinablagerung um maligne Tumoren als eine Tumorabwehrreaktion.

2.2. Fibrinolytische Eigenschaften

Fibrinolyse bedeutet die Auflösung eines Fibringerinnsels im Blut oder Plasma, sie steht mit der Gerinnung im Gleichgewicht. Wird die Gerinnung stimuliert, z.B. im Schock, bei Anoxämie, durch einen Tumor, so kommt auch die Fibrinolyse reaktiv in Gang. Dies kann zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) und reaktiv zur Verbrauchskoagulation führen.

Nicht alle Tumoren haben die Fähigkeit zur Fibrinolyse. Dies soll eine kurze Aufstellung der fibrinolytischen Eigenschaften der Tumoren wiedergeben:

Plattenepithelcarcinome: Geringe fibrinolytische Aktivität (55)

Adenocarcinome des Gastrointestinaltraktes:

Variierende fibrinolytische Aktivität (55)

Menschliche Tumoren der Mundregion in vitro kultiviert: Freisetzung von Plasminogenaktivatoren (12)

Humanes Ovarialcarcinom: Sehr hohe fibrinolytische Aktivität (9, 72, 73)

Riesenzellcarcinom der Lunge: Reich an Plasminogenaktivator (7)

Hepatozelluläres Carcinom: Hohe fibrinolytische Aktivität auf einzelne Zellen beschränkt (54)

Mammacarcinom: E. Cliffton und C. Grossi (23) fanden eine hohe fibrinolytische Aktivität im normalen Brustgewebe, während das Mammacarcinom zumindest einen Aktivator des humanen Plasminogens enthielt. H.I. Peterson et al. fanden zunächst keine (57), später aber (54) hohe fibrinolytische Aktivität im Mammacarcinom in 40 bis 50%.

Im normalen Gewebe scheint die fibrinolytische Aktivität an die Endothelien der Gefäße gebunden zu sein. Es bestehen aber noch erhebliche Differenzen darüber, ob sie mehr den arteriellen oder mehr den venösen Gefäßen zugeordnet werden soll. Im Tumorgewebe wird einerseits als Ort der fibrinolytischen Aktivität die Tumorzelle selbst genannt. H.I. Peterson et al. (54) fanden die hohe fibrinolytische Aktivität in aggregierten oder separaten Tumorzellen lokalisiert. Die transformierten Fibroblasten setzten nach Rifkin et al. (62) einen Plasminogenaktivator frei.

Andererseits berichteten einige Untersucher, daß die fibrinolytische Aktivität von Ovarialtumoren auf kleine versorgende Gefäße beschränkt seien (73). Björlin et al. (12) waren der Meinung, die

fibrinolytische Aktivität eines Tumors hänge möglicherweise enger mit seiner Vaskularisierung als mit seinem Malignitätsgrad zusammen.

E. Reich (59) zeigte im Experiment, daß der Serumfaktor Plasminogen (MG 90000) von einem Zellfaktor, der nur aus transformierten Zellen kommt, nämlich der argininspezifischen Serinprotease mit einem MG von 38000, hydrolysiert wird. Durch die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung wurde das Plasminogen zu Plasmin aktiviert. Dies konnten 1976 B. Aastedt und L. Holmberg (7) bestätigen, die allerdings den Aktivator des Plasmins als eine Serinprotease mit MG von ca. 50000 identifizierten. Zugleich wiesen sie durch Neutralisation und Immundiffusion nach, daß der Plasminogenaktivator, den das Ovarialcarcinom freisetzt, immunologisch mit der Urokinase identisch sei.

Peterson et al. (54) fanden bei humanen Mammacarcinomen mit großer fibrinolytischer Aktivität eine signifikant erhöhte Neigung zu invasivem Wachstum und Metastasenbildung in regionalen Lymphknoten im Gegensatz zu den Mammacarcinomen mit geringer fibrinolytischer Aktivität. Daraus folgerten sie, daß die Fibrinolyse eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren sei.

Peterson 1968 (55) und H.I. Peterson und C.M. Rudenstam (57) vermuteten, daß die Fibrinablagerung im malignen Tumor Teil einer Tumorabwehrreaktion sein könnte und meinten, eine hohe fibrinolytische Aktivität im Tumor könnte die lokale Fibrinablagerung reduzieren und so das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren begünstigen.

3. Invasives Wachstum

Lückenhafte Kenntnisse bestehen noch darüber, wie das invasive Wachstum eines Tumors vor sich geht und von welchen Faktoren es abhängt. O'Meara schlug vor, daß die thromboplastischen Eigenschaften des Tumors am infiltrativen Wachstum beteiligt seien. Er hielt es für möglich, daß das abgelagerte Fibrin um den Tumor organisiert wird und als Matrix und Stroma für das Tumorstadium dient. M. Abercrombie et E.J. Ambrose (1) hielten die aktive Zellokomotion für den Mechanismus des invasiven Wachstums, worunter sie die Adhäsion und das Eindringen in solides Gewebe verstanden. Auch normale adulte Zellen besitzen die Fähigkeit der Lokomotion, obwohl sie sich nicht in größerem Maße zwischen anderen Zellen bewegen, denn sie unterliegen der Kontaktinhibition -

welche die Tumorzellen verloren haben - und sie befinden sich in einem Zustand geringer mitotischer Aktivität.

Die Richtung der Lokomotion normaler Zellen in den freien Raum könnte sich aus der gegenseitigen Abstossung, wie sie die Kontaktinhibition bewirkt, ergeben. Tumorzellen können die Gewebestruktur als Leitschiene für ihre Lokomotion benützen, da sie nicht der Kontaktinhibition unterliegen. Die mitotische Aktivität und die Mobilität von normalen Zellen während der Proliferation unterscheidet sich nicht von Tumorzellen. Der Unterschied liegt in der permanenten Proliferation von Tumorzellen (1).

Anderer Untersucher meinten, die fibrinolytischen und proteolytischen Eigenschaften seien am Wachstum des Tumors beteiligt. E. Clifton und C. Grossi (23) vertreten die Ansicht, daß möglicherweise proteolytische Aktivität und Verdauung des umgebenden Gewebes oder Hyaluronidaseaktivität gegen die Grundsubstanz des umgebenden Gewebes von Bedeutung sein könnten. So brachten H.I. Peterson et al. (54) die hohe fibrinolytische Aktivität des Mammacarcinoms mit einer größeren infiltrativen Tendenz und der Fähigkeit in die regionalen Lymphknoten zu metastasieren in Verbindung und vermuteten eine

Plasminogenwirkung gegen die Zellkohäsion des primären Tumors.

4. Metastasierung

Die Metastasierung erfolgt über die Arrodierung von Blut- und Lymphgefäßen, sowie der Ablösung der Tumorzellen vom Tumorzellverband. Tumorzellen können während des Transportes im Blut vernichtet werden. Ob dies durch die körpereigene Abwehr mittels T-Lymphozyten geschieht oder welche Mechanismen sonst an der Zerstörung beteiligt sind, ist nicht gesichert. Bei der Ausbreitung der Tumorzellen über die Lymphwege wirken die Lymphknoten als mechanisches Hindernis, in dem sie steckenbleiben. Fraglich erscheint, ob in den Lymphknoten als dem Sitz von Immunvorgängen die zelluläre oder humorale Abwehr zum Einsatz gelangt. Bei der Einnistung der Tumorzellen kommt wieder die Fähigkeit zur Infiltration zur Anwendung. Zuerst aber müssen die Tumorzellen am Endothel haften. Die Fibrin- und Thrombusbildung um die Tumorzellen sind dazu die entscheidenden Faktoren. Die verklumpten Tumorzellen bleiben so leichter in den Kapillaren stecken und können von dort aus das Endothel permeieren und ins Gewebe infiltrieren. Im Experiment konnten eine Reihe von Autoren die Bedeutung der Thrombusbildung für die Metastasierung bestätigen (17,31,33). Mehrere Autoren (17,21,42) zeigten, daß bekannte

Faktoren, die das Gerinnungssystem oder die Haftungsneigung des Endothels stimulieren können - insbesondere Traumen - zu einer Zunahme der Metastasenentwicklung führen. Umgekehrt brachten Faktoren, die die Gerinnung hemmen (Heparin, Kumarine und induzierte Fibrinolyse), eine Reduktion der Metastasenbildung (50, 75).

5. Bedeutung der speziellen Tumoreigenschaften für die Tumordiagnose

F. Schmidt und H. Albers (68) fanden bei Ratten mit Yoshida- und Jensensarkom erhöhte Spiegel an Fibrinogen im Plasma. Beim Menschen schwanken die Plasmafibrinogenspiegel zwischen 250-350 mg%. Der Plasmafibrinogenspiegel hängt ab von der Bildung in der Leber und dem Fibrinogenverbrauch. Beim metastasierenden Prostatacarcinom ist dieser Spiegel erniedrigt, bei anderen Malignomen dagegen erhöht, wie z.B. beim Bronchialcarcinom, M. Hodgkin und bei Leukämien.

Diagnostische Bedeutung hat weiterhin die Bestimmung der Fibrinogenspaltprodukte (FDP) im Serum und im tumorbedingten Ascites. Mehrere Beobachter fanden eine erhöhte Konzentration der FDP im Serum von Patienten mit malignen Tumoren (9, 37). Erklärungen für das Auftreten von FDP im Serum von Trägern maligner Tumoren sind (9,73) das Entkommen von Aktivatoren der

der Fibrinolyse in den Blutstrom, die sekundäre Fibrinolyse durch thromboplastische Substanzen und lokal gebildetes FDP. Über die diagnostische Aussagekraft mögen folgende Zahlenangaben orientieren: Erhöhung der FDP bei malignen Tumoren in 72% (23 Fälle), bei benignen Veränderungen in 45% (59 Fälle), wobei eine Abwesenheit der FDP die Malignität nicht ausschließt, ihre Anwesenheit eine Verdachtsdiagnose aber unterstützt und weitere Untersuchungen indiziert (9). Besondere Bedeutung haben die sehr hohen FDP-Werte im Ascites bei Ovarialcarcinomen. So war selbst die kleinste FDP-Konzentration im malignen Ascites größer, als die größte im benignen Ascites (71).

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang sind die erhöhte Thrombembolieinzidenz und eine hämorrhagische Diathese, die als Vorboten oder als Frühsymptome einer beginnenden malignen Erkrankung Bedeutung haben.

6. Therapie

6.1. Modelle zur Funktion des Fibrins in und um das Tumorgewebe

Viele Untersucher konnten die Fibrinablagerungen um den Tumor nachweisen (47, 49). G. Mider et al. (51) fanden eine Zunahme des Blutfibrinogen-

spiegels während des Tumorwachstums. Viele Forscher sind deshalb der Ansicht, daß das kumulierte Fibrin mit Wachstum und Ausbreitung des Tumors zusammenhänge. Folglich müsste sich mit einer Therapie, die die Fibrinmassen in und um den Tumor beeinflusst, ein positives Ergebnis in der Hemmung des Tumorwachstums und Metastasierung erbringen lassen. Als Basis für eine solche Theorie wurden folgende Hypothesen zur Funktion des Fibrins aufgestellt: Fibrinbildung als Tumorabwehrreaktion. Der Körper setzt sich analog dem Entzündungsgeschehen mit einer Fibrinablagerung und Fibrinorganisation um den Tumorherd zur Wehr (55, 66). Die hohe spontane fibrinolytische Aktivität einiger Tumoren könnte der lokalen Fibrinablagerung entgegenwirken und so Wachstum und Ausbreitung begünstigen. O'Meara (47) fand den CCF, der aus den Tumorzellen diffundiert und so um die Tumorzellen das Fibrinogen präzipitiert, welches er als Stroma und Matrix für weiteres Wachstum benötigt. S. Dahl (25) stellte die Hypothese auf, das Fibrin bilde eine Barriere um den Tumor, wodurch die Oxygenierung des Gewebes gehemmt und so das Tumorwachstum auf

Kosten normaler Zellen gefördert wird. Die durch die Fibrinablagerung entstehende Fibrose könnte die Tumorzellen strangulieren (20).

J. Ries et al. (61) hielten es für möglich, daß die Fibrinpräzipitation das morphologische Äquivalent eines Immunvorganges sein könnte.

Im nachfolgenden seien zwei Hypothesen zur Funktion des Fibrins bezüglich der Metastasierung genannt: Damit Tumorzellen und normale Zellen am Endothel anhaften können, muß zuerst ihre Haftfähigkeit gesteigert werden, und sie müssen mit Fibrin verklumpt werden. Dann erst könne eine Thrombusbildung stattfinden. Die Klumpung sei notwendig, da die meisten Zellen das Kapillarnetz passieren können (4).

C. Rudenstam (65) meinte, Fibrin könnte die Metastasen dadurch reduzieren, daß es die Tumorzellen festhält; dies steht im Gegensatz zur Ansicht O'Meara's (48), wonach Fibrin das Wachstum fördere. Schließlich könnte sich lokale Fibrin- und Thrombusbildung in einer Abnahme der Tumorzellfreisetzung durch Beeinträchtigung der Zirkulation ausdrücken (57).

6.2. Antikoagulantien

Antikoagulation kann erreicht werden über eine kompetitive Verdrängung des Vitamin K; dadurch

wird die Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X gehemmt. Solche kompetitive Hemmer der Blutgerinnung sind die Dicumarolderivate. Auf einem anderen Mechanismus beruht die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins. Heparin ist ein Antagonist des Prothrombins und Cofaktor des Antithrombins III. Bei der von J. Ries et al. (61) 1968 durchgeführten Münchner Studie über den Einfluß der Antikoagulation auf die Rezidivrate und Überlebensrate bei Patientinnen mit Kollumcarcinom der Stadien II oder III kam er zu folgenden Ergebnissen: Die Frührezidivrate zwischen dem 5. und 18. Monat konnte gegenüber nicht mit Antikoagulantien behandelten Patientinnen von 22,9% auf 12,6% gesenkt und die Fünf-Jahres-Überlebensrate geringfügig verbessert werden. Die Metastasenbildung wurde gebremst, weil die Antikoagulation der Fibrinapposition und Fibrinbrückenbildung zwischen den Tumorzellkonglomeraten und dem Endothel entgegenwirkte. H. Ludwig (45) erklärte diese Ergebnisse mit einer Zerstörung der Adhäsivität und der Wachstumsschiene des Fibrins durch Heparin, was zur Abnahme der Fibrinvernetzung führt. Weiter zog er als Erklärung dafür die Inhibition der Thromboplastinregeneration und der Thrombinbildung, die Antithrombinwirkung, die Mitose-

hemmung des Heparin heran. Andere Autoren konnten keinen wachstumshemmenden (antimitotischen) Effekt des Heparins finden (44, 29). Die Verminderung der Erythrozytenaggregation führt zur Veränderung der Hämodynamik des Blutes. Tumorzellen könnten so in den Axialstrom und damit leichter in kleinste Gefäße gelangen, wo sie zerstört würden oder Metastasen setzten. Der Sinn dieser Wirkung läge in einer Umverteilung an Orte, die nicht so gut wie die Lungen für das Tumorwachstum geeignet sind. So könnte z. B. eine Zerstörung in der Milz stattfinden (13). Heparin hat eine starke negative elektrische Ladung und könnte somit- gebunden an Tumorzellen - eine Abstossung der Tumorzellen vom Endothel bewirken. Heparin - ein starker anionischer Komplex - bindet sich an Tumorzellen, was zur Desaggregation der Tumorzellen und zu elektrostatischer Abstossung führt. Das bewirkt eine leichtere Kapillarpassage und eine schlechtere Haftung am Endothel, was die Zirkulationszeit der malignen Zellen verlängert (70). Die rezirkulierenden Zellen werden in der Lunge gefangen und führen zu zahlreichen Metastasen, oder sie werden - wenn sie nicht in zu großer Zahl auftreten - von der körpereigenen Abwehr

reduziert. I. Kirikuta et al. (40) berichteten von einer gleichzeitigen Heparintherapie und Stimulation des retikuloendothelialen Systems, das eine stärkere Reduktion der Metastasen bewirkte als eine Monotherapie.

6.3. Fibrinolytika

Der Einfluss eines Fibrinolytikums müsste sich , der Theorie S. Dahls (25) folgend, wonach das Fibrin die Oxygenierung des Gewebes behindert und so das Tumorzellwachstum auf Kosten normaler Zellen fördert, bei Behandlung eines Tumorpatienten mit einem Fibrinolytikum in einer Verbesserung des Krankheitszustandes zeigen. In einer Langzeitbehandlung mit Plasmininfusion bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Tumor (20 Patienten) zeigte sich keine Verbesserung ihres Zustandes. Es war kein Unterschied zur Kontrollgruppe festzustellen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer dänischen Forschungsgruppe. R. Thornes et al. (74) stellten fest, daß verschiedene Fibrinolytika das in-vitro-Wachstum von HeLa-Zellen hemmten.

Plasmin könnte spezifisch über die Tumorzellablösung eine Beeinflussung der Metastasierung bewirken, da möglicherweise die Einflussnahme auf die Thrombusbildung und den Blutfluss

eine Tumorzellablösung auslösen können (55). C. Rudenstam (65) zeigte tierexperimentell eine vermehrte Inzidenz pulmonaler Metastasen, was er auf vermehrte Tumorzellfreisetzung aufgrund intravaskulärer Fibrinolyse und damit verbesserter Zirkulation zurückführte. H.I. Peterson (55) meinte, die induzierte Fibrinolyse vermindere die Metastasenbildung durch längere Zirkulation der Tumorzellen. Bei einem fibrinolytisch aktiven Sarkom fand er die Zahl der Metastasen unbeeinflusst. Andere Untersucher erzielten unter Behandlung mit Plasmin eine Reduzierung der Inzidenz experimenteller Metastasen (20).

6.4. Antifibrinolytika

Die antifibrinolytische Wirkung der Epsilon-Aminocapronsäure (EACA) entdeckten S. Okamoto et al. Später fanden S. Okamoto et al. die antifibrinolytische Wirkung der Aminomethylcyclohexancarboxylsäure (AMCHA) und erforschten die Wirkungsstärke der verschiedenen Antifibrinolytika (52). Bei einer Wirkungsstärke von 1 für EACA fanden sie 0,2 für cisAMCHA, 7 für cis/transAMCHA und 26 für transAMCHA. EACA und AMCHA hemmen als non-kompetitive Plasminhemmer (41,69) die Akti-

vatoren des Plasminogens. AMCHA verändert die Struktur des Plasminogens, weshalb weniger Plasmin gebildet wird (63).

Der Einsatz der Antifibrinolytika erfolgte aufgrund folgender Hypothesen: Die Tumoren mit hoher spontaner fibrinolytischer Aktivität können das Fibrin, das der Körper analog dem Entzündungsgeschehen um den Tumor ablagert, auflösen und so wachsen, sich ausbreiten und metastasieren. Ein Antifibrinolytikum würde die Fibrinolyse hemmen und somit Wachstum und Metastasierung einschränken.

EACA scheint eine grössere immunosuppressive Wirkung zu haben als AMCHA, was ein Wachstum des Tumors, bzw. der Metastasen begünstigen würde.

Bei den bisherigen Untersuchungen fand sich bei mehreren Forschern eine Reduktion des Tumorwachstums unter antifibrinolytischer Therapie, sei es mit EACA oder AMCHA (55, 65). B. Boeryd (13) stellte eine Abnahme der Zahl der Lungenmetastasen, wenngleich nicht signifikant, aber eine Volumenzunahme der einzelnen Metastasen fest. Im Untersuchungsgut von E. Clifton und D. Agostino (21) entwickelte sich unter EACA- und Trasyloltherapie eine vermehrte Metastasenbildung. Die Zunahme des

mittleren Volumens der Metastasen in den Untersuchungen von B. Boeryd bzw. der vermehrten Metastasenbildung bei Cliffton & Agostino wäre erklärbar mit der aggregationsfördernden und der die Siebfunktion der Lunge unterstützenden Wirkung der Antifibrinolytika. Die Zahl der Metastasen in der Lunge hängt also von folgenden zwei Faktoren ab: Sie nimmt ab bei reduziertem Tumorwachstum durch AMCHA, durch intravasale Gerinnung und durch Blutstase in den Tumorgefäßen, so daß keine Tumorzellen disseminieren. Sie nimmt hingegen zu durch die Unterstützung der Siebfunktion der Lunge und der Förderung der Tumorzellaggregatbildung durch Antifibrinolytika. Da aggregierte Zellen grössere Volumina der Meastasen bewirken, kann auch das Volumen der Metastasen erhöht sein.

B. Astedt et al. (6) beschrieben eine Patientin mit einem metastasierenden Ovarialcarcinom, welche mit Heparin und AMCHA behandelt wurde. Infolge der Therapie kam es zu einer durch Laparatomie gesicherten Einkapselung des Tumors mit Fibrin und zu einer Wachstumshemmung. Die FDP waren minimal (20 - 40 Mikrogramm/ml), die Bildung von Ascitesflüssigkeit ging wesentlich zurück. Die Patientin befand sich zwei Jahre in einem guten Zustand.

7. Begründung und Abgrenzung der Arbeit, Arbeitshypothese

Die Durchsicht der bisherigen Arbeiten über Fibrinolyse und Antifibrinolyse bei malignen Tumoren, insbesondere des Mammacarcinoms der Maus, regte uns an, einigen der noch nicht behandelten Fragen nachzugehen.

O'Meara's Forschungen ergaben eine geringe fibrinolytische Aktivität des Mammacarcinoms der Maus bei gleichzeitig hoher koagulativer Aktivität. H.I. Peterson et al. (54) wiesen im Gegensatz dazu wiederholt in bis zu 50% der Maus-Mammacarcinome eine hohe fibrinolytische Aktivität nach. Das humane Mammacarcinom besitzt eine starke fibrinolytische Aktivität. Widersprüchliche Ergebnisse beschrieben verschiedene Autoren bezüglich der Wirkung der induzierten Fibrinolyse mit Plasmin.

O'Meara und A. Thornes (49) wiesen nach, daß Plasmin und Protamin als Gegenspieler des Gewebsthromboplastin eine Tumorregression bewirkten. Im Untersuchungsgut von H.I. Peterson (55) ergab sich eine Zunahme des Tumorgewichtes unter Plasmintherapie (mit Plasminogen und Streptokinase), während H.I. Peterson und C. Rudenstam (57) sowie B. Fisher und E. Fisher (29) keine Wirkung auf das Tumorgewicht fest-

stellen konnten.

Die bisher vorliegenden Arbeiten über die Wirkung der AMCHA bzw. EACA auf die Wachstumsrate und Metastasierung zeigen, daß die Antifibrinolytika die Wachstumsrate und pulmonale Metastasen sowohl herabsetzen als auch vermehren können. H.I. Peterson konnte mit AMCHA die Wachstumsrate (Tumorgewicht) und die Zahl der pulmonalen Metastasen in einem Maus-Mammarycarcinom mit geringer fibrinolytischer Aktivität (55) senken, womit er sich in Einklang mit den Ergebnissen von C. Rudenstam (65) befand.

In den Untersuchungen von Mider et al. (51) zeigte sich eine Zunahme des Plasmafibrinogenspiegels während des Tumorwachstums. In Verbindung mit lokaler Fibrinablagerung im Tumorgewebe und einem schnellen Verfall des markierten Fibrinogens im Tumorgewebe und einer Hemmung des schnellen Verfalls durch EACA (Bale et al. 11) könnte dies als Tumorabwehrreaktion aufgefasst werden. Boeryd et al. (16) fanden unter EACA-Therapie - verglichen mit Kontrollen - eine Zunahme der Zahl der Lungenmetastasen, während Heparin diese Parameter reduzierte. B. Fisher und E. Fisher (29) konnten mit EACA die Tumorzellretention in den Lungen nicht beeinflussen.

Einige Autoren befassten sich mit der Frage der Überlebenszeit von Malignomträgern.

In Tierversuchen wurde bisher der Frage nach Überlebenszeit sowie Tumorwachstum bei gleichzeitiger Therapie mit einem Antifibrinolytikum noch nicht nachgegangen. Auch wurde noch nicht gezeigt, ob die Therapie in dieser Applikationsweise und -menge einen direkt meßbaren Einfluss auf die fibrinolytische Aktivität des Tumors hat. Es wurde beispielsweise die Überlebenszeit von Tieren mit i.p.-Injektion von Ehrlich's Ascites Carcinom gemessen. Die Überlebenszeit mit TA_3 -Tumor bei Mäusen wurde ebenfalls bestimmt, jedoch ohne eine Therapie durchzuführen. Die Versuche mit AMCHA und EACA hatten den Zweck, den Einfluss auf die Tumorwachstumsrate zu ermitteln, jedoch wurde hier die Überlebenszeit nicht bestimmt.

Der Einfluss der antifibrinolytischen Therapie auf die fibrinolytische Aktivität des Tumors wurde bisher nur indirekt anhand der Tumorwachstumsrate und der Metastasierung abgeschätzt, oder durch Messung der FDP im Serum bzw. Ascites, gelegentlich anhand der Lyse eines Koagels in vitro bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit soll dargestellt werden, wie sich die antifibrinolytische Therapie

auf Überlebenszeit und Tumorgewicht an einem Tier auswirkt. Im Unterschied zu anderen Experimenten wird die AMCHA erst dann verabreicht, wenn bei den meisten Mäusen ein Tumor tastbar wird, also zehn Tage nach der intramuskulären Injektion von Tumorzellen. Damit sollen die Bedingungen nachgeahmt werden, die in der Therapie von menschlichen Malignomen gelten, nämlich der Einsatz der Therapie erst nach Diagnosestellung. Bewiesen werden soll die antifibrinolytische Wirkung durch Testung der fibrinolytischen Aktivität des Tumorgewebes auf Fibrinplatten nach der Methode von T. Astrup und S. Müllertz (10). Damit soll untersucht werden, ob AMCHA in der Carcinombehandlung, insbesondere in der Verlängerung der Überlebenszeit, wirksam ist. Mit Hilfe des histochemischen Nachweises der fibrinolytischen Aktivität soll die Höhe und der Ort der Fibrinolyseaktivität ermittelt werden.

Die antifibrinolytische Therapie wurde von uns unter folgender Vorstellung über die Wirkungsweise durchgeführt: Deutet man die Fibrinablagerung um den Tumor, die oft beobachtet wurde, als Abwehrreaktion des Körpers, die Gefäßverschlüsse, Prästase, Stase, Reduktion der Sauerstoffversorgung und mangelhafte Nährstoffzufuhr bewirken soll, so sind die Tumoren mit

spontaner fibrinolytischer Aktivität in der Lage, der Fibrinablagerung entgegenzuwirken und so die Voraussetzungen für invasives Wachstum, Metastasierung und genügend großen Blutfluss durch Verhinderung der Stase zu schaffen. Die antifibrinolytische Therapie würde diese Fähigkeit des Tumors neutralisieren. Dies sollte zur Tumorregression, Abnahme der Metastasierung und Verlängerung der Überlebenszeit führen. Die Hemmung der fibrinolytischen Aktivität im Tumorgewebe müsste *in vitro* durch Reduktion der Fibrinolysefläche auf der Fibrinplatte nachweisbar sein.

II. Hauptteil

1. Material und Methodik

1.1. Material

Es wurden männliche Mäuse vom Stamm NMRI-Orig/KiBlegg von S. Ivanovas, Medizinische Versuchstierzuchten KG, KiBlegg im Allgäu verwendet. Das Alter betrug zwischen 6 und 12 Wochen, das Gewicht zwischen 25 und 45 Gramm. Alle Tiere erhielten die gleiche Standarddiät Altromin und Wasser ad libitum. Zur Erzeugung von soliden Tumoren wurde das Ehrlich Ascites Carcinom (EAC), welches uns Professor Raves vom Pathologischen Institut in München, Thalkirchnerstr. 36, freundlicherweise zur Verfügung stellte, verwendet.

Die antifibrinolytische Therapie erfolgte mit der Aminomethylcyclohexancarboxylsäure (AMCHA). Folgende weitere Materialien wurden verwendet: Forschungsfibrinogen human von Kabi (2,7% Plasminogengehalt), welches uns - ebenso wie die AMCHA - die Firma Deutsche Kabi GmbH, München, Levelingstr. 18, freundlicherweise zur Verfügung stellte. Fibrinogen human (Plasminogengehalt $\leq 1\%$) von der Firma Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Testthrombin von Behringwerke; Gentamycin, Natriumazid (NaN_3), Teststreptokinase von Behringwerke, 5,5-Diäthylbarbi-

turat-Natrium-Puffer aus 0,05 M Sodium-diethylbarbiturate, 0,093 NaCl, 1,66 mM CaCl_2 , 0,69 mM MgCl_2 , mit 2n HCl auf pH 7,8 eingestellt. Nachfolgende Geräte wurden benutzt: Ott-Kompensationsplanimeter, Meßfehler 0,1 %; Analysenwaagen; Tiefkühltruhe mit -30°C ; Inkubator.

Für die Versuche mit den Fibrinplatten dienten Petrischalen aus Plastik, 100 x 15 mm.

1.2. Methodik

Das Ehrlich's Ascites Carcinom wurde fünf Mäusen des von uns verwendeten Stammes intraperitoneal injiziert. Die sich entwickelnde Ascitesflüssigkeit mit Carcinomzellen wurde am 11. Tag nach i.p.-Injektion abpunktiert und miteinander vermischt. Die Zellzahl betrug ca. 40 Millionen Zellen/ml. Insgesamt ergaben sich 20 ml Flüssigkeit. Die mikroskopische Untersuchung zeigte geringe Mengen von Erythrozyten und Leukozyten, die meisten Zellen zeigten die charakteristischen Eigenschaften von Carcinomzellen. Das milchig-gelbliche Punktat wurde sofort in die Versuchsmäuse intramuskulär gluteal bzw. an der proximalen vorderen

Extremität in einer Menge von 0,4 ml/Maus appliziert. Nach 10 Tagen konnten 80% der nun solide gewachsenen Tumoren getastet werden. Zu diesem Zeitpunkt setzte die Therapie mit AMCHA ein, (die im Trinkwasser auf eine Konzentration von 3% eingestellt wurde). Die Mäuse hatten freien Zugang zu dieser Präparation. Die Mäuse wurden in folgende sechs Gruppen aufgeteilt:

	Inj.Ort	Therapie	Gewicht	Zahl
Gruppe 1:	gluteal	AMCHA	26-31g	20
Gruppe 2:	gluteal	--	25-30g	21
Gruppe 3:	vord.Extr.	--	34-39g	7
Gruppe 4:	--	--	40-45g	10
Gruppe 5:	--	AMCHA	35-45g	5
Gruppe 6:	gluteal	--	35-45g	9

Nach dem spontanen Tod der Mäuse in den Gruppen 1,2, und 3 wurden der Tumor, die Lunge, die Leber und das Herz möglichst steril präpariert und makroskopisch betrachtet. Dabei wurde die Lunge zuvor mit 0,9% NaCl-Lösung aufgeblasen, um eventuell vorhandene Metastasen zu entdecken. Die Organe und Tumoren wurden in Tiefkühlplastiktüten verpackt und bei -30°C tiefgefroren. Nach neun bis zwölf Monaten wurden sie auf ihre fibrinolytische Aktivität hin getestet. Die Mäuse der

Gruppen 4 und 5 trugen keinen Tumor und dienten als Kontrollgruppen. Nach 47 Tagen wurden diese Tiere getötet, die Lunge und das Muskelgewebe entnommen und ebenfalls auf fibrinolytische Aktivität untersucht. Die Untersuchungen wurden in zwei Abschnitten durchgeführt:

- a) Bestimmung der Überlebenszeiten und Tumorgewichte in den Gruppen 1,2,3 und 6
- b) Fibrinolysemessungen in den Gruppen 1 - 5.

1.2.1 Fibrinolysemessungen

Die Untersuchungen der verschiedenen Gewebe auf ihre fibrinolytische Aktivität erfolgte mit der modifizierten Fibrinplattenmethode nach Astrup und Müllertz (10). Die Methode eignet sich zur Messung der fibrinolytischen Aktivität von Enzymen, die imstande sind Fibrin abzubauen. Die Herstellung der Fibrinplatten mit zwei verschiedenen Plasminogengehalten (2,7% und 1%) erfolgte auf folgende Weise: 20 mg Fibrinogen wurden in 2ml physiologischer Kochsalzlösung bei 37° C im Inkubator gelöst. Pro Platte wurden folgende Substanzen in unten angegebener Reihenfolge verwendet: Fibrinogenlösung (s.o.), 3ml physiologische Kochsalzlösung, 4 ml 5,5-Diäthylbarbiturat-Natrium-Puffer. Als antibakterieller Schutz wurde bei allen Platten 20 Microliter

Gentamycin und 3 mg Natriumazid pro Platte zugesetzt. Einigen Platten wurde 20 Microliter AMCHA zugegeben. Die Platten wurden mit 0,2 ml Testthrombin (30 IE/ml) versetzt. Nach ca. zehn Minuten war alles Fibrinogen in Fibrin übergeführt und die Fibrinplatten wurden fest. Insgesamt wurden vier verschiedene Platten angefertigt:

Platte A hat einen Plasminogengehalt von 2,7 %

Platte B enthält zusätzlich 20 Microliter AMCHA

Platte C hat einen Plasminogengehalt von 1 %

Platte D enthält zusätzlich 20 Microliter AMCHA

Zur Testung der Fibrinplattenqualität wurde Streptokinase von Kabi (Kabikinase) - in physiologischer Kochsalzlösung gelöst - in zunehmender Verdünnung auf die vier Plattentypen in gleichem Volumen von 10 Microliter aufgetragen und anschließend die entstandenen Lyseflächen gemessen. Auf den Platten B und D zeigte sich keine Lyse. Die Testung der Fibrinplattenqualität ergab auf den Platten A und C im Messbereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Enzymkonzentration und der Größe der Lysehöfe. Die Lysen auf der Fibrinplatte mit 2,7% Plasminogengehalt waren um etwa 400 mm^2 größer als auf der mit 1% Plasminogengehalt. Die Größe der Lysehöfe wurde mit dem

Planimeter gemessen und gab genauere Werte als die Durchmesserbestimmung, da die Lysehöfe gelegentlich nicht genau kreisrund waren. Eichkurve siehe Abb. 1

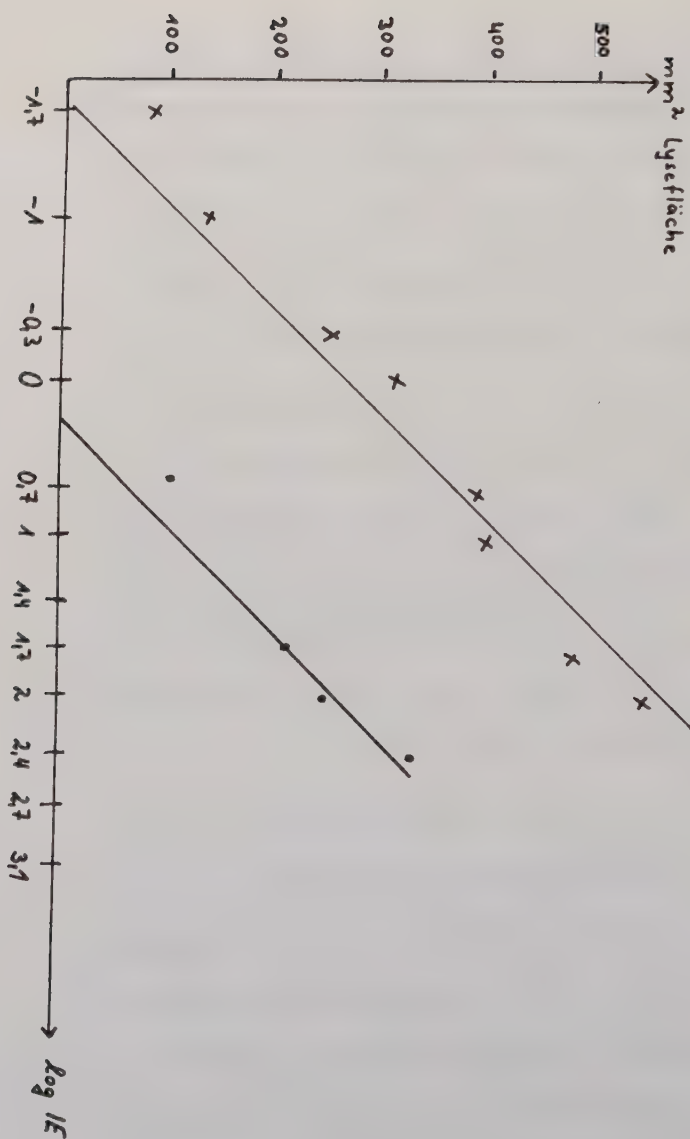
Zur Testung der Gewebe wurde vom tiefgefrorenen Gewebe ein Stück abgeschnitten und auf 10 mg ausgewogen. Diese Stücke wurden auf die Fibrinplatten gelegt und eingedrückt, so daß sich sofort eine Flüssigkeitsschicht um das Gewebe bildete und dieses vor Austrocknung schützte. Nach Inkubation bei 37°C für 18 Stunden erfolgte eine kurze Abkühlung auf Zimmertemperatur und dann die planimetrische Auswertung. Die entstandenen Lyseflächen waren durchsichtig und flüssig, im Gegensatz zum nichtlysierten, leicht milchig-trüben Bereich (Abb. 6).

1.2.2. Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe mehrerer unten genannten Tests und der linearen Regression. Als Maß für die Signifikanz wurde beim Vergleich verschiedenartiger Meßwerte innerhalb einer Gruppe der Korrelationskoeffizient errechnet. Beim Vergleich gleichartiger Meßwerte zwischen den Gruppen fand der Wilcoxon-Rang-Test (ungepaart) Anwendung, da er gegenüber dem t-Test den Vorteil hat, nicht eine Normalverteilung

Abb. 1

Beziehung der Größe der Lysehöfe in mm^2 zum Logarithmus der Einheiten der Kabikinas auf Fibrinplatten



zur Voraussetzung zu haben.

Der Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um die Signifikanz festzustellen, mit der die Fibrinolyse bei verschiedenen zu vergleichenden Gruppen eintritt, ohne die Größe der Fibrinolyseflächen zu berücksichtigen.

2. Ergebnisse

Alle Mäuse, denen Carcinomzellen injiziert wurden, entwickelten einen soliden Tumor.

2.1. Bestimmung der Überlebenszeit (ÜZ)

Gemessen wurde der Zeitraum vom Tag der Tumorzellinjektion bis einschließlich Todestag. Insgesamt wurden 57 Tiere in diesem Versuch verwendet, wovon 20 Mäuse mit AMCHA behandelt wurden und 37 Mäuse keine Behandlung erhielten.

Gruppe 1: (behandelt)

Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug 35,5, Tage. Die kürzeste ÜZ einer Maus betrug 12 Tage, die längste 56 Tage. (Abb. 2)

Gruppe 2 + 6: (unbehandelt)

Die durchschnittliche ÜZ einer Maus war 35,1 Tage, die kürzeste ÜZ betrug 21 Tage, die längste 56 Tage. (Abb. 2)

Abb. 2

Durchschnittliche (a), kürzeste (b) und längste (c)
Überlebenszeit der Mäuse der Gruppen 1, 2, 3 und 6

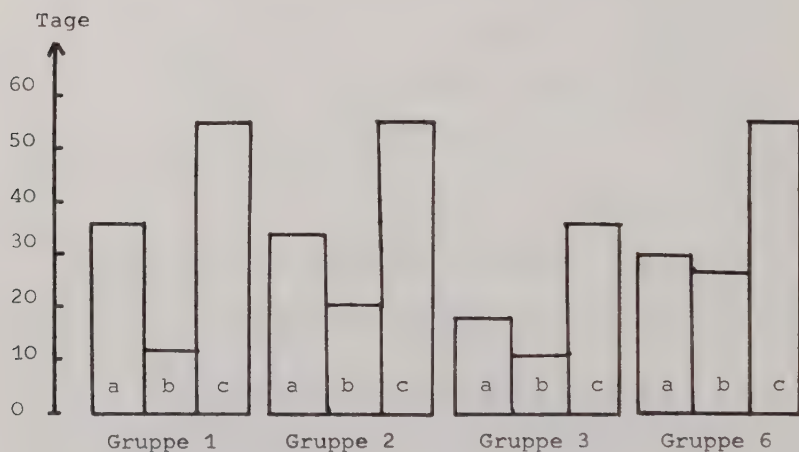
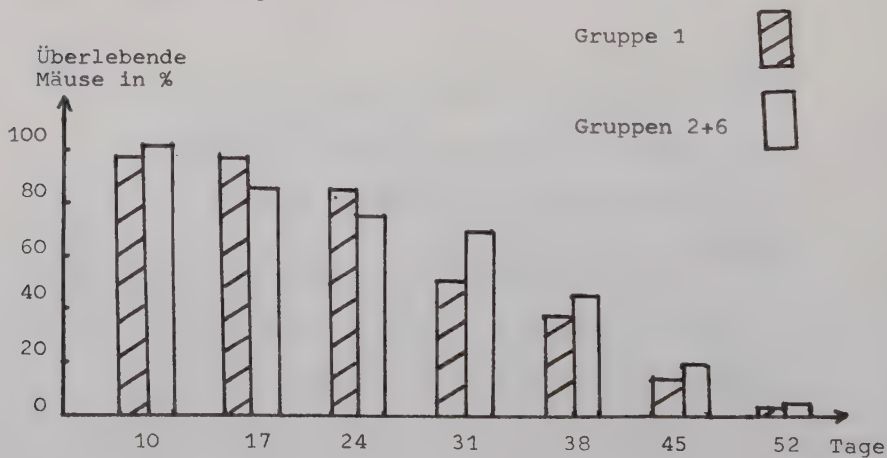


Abb. 3

Zahl der überlebenden Mäuse der Gruppen 1 und 2+6
(in Prozent) 10, 17, 24, 31, 38, 45 und 52 Tage
nach Tumorzellinjektion



Gruppe 3: (unbehandelt)

Die durchschnittliche ÜZ betrug 18,7 Tage, die kürzeste ÜZ 12 Tage, die längste ÜZ 36 Tage (Abb. 2).

Gruppe 4 + 5: (Kontrollgruppe ohne Tumor)

Alle Tiere haben überlebt.

Eine Zusammenstellung der Überlebenszeiten ist in Tabelle 1 zu finden.

Zählt man die Zahl der Überlebenden Mäuse der Gruppe 1 sowie der Gruppen 2 + 6 in wöchentlichen Abständen, so erkennt man, daß etwa gleich viele Tiere in den verschiedenen Gruppen sterben (Abb. 3).

Der Wilcoxon-Rang-Test ergab keinen Unterschied in der Überlebenszeit der Gruppen 2 und 6.

Ebensowenig unterschied sich die ÜZ der Gruppen 1 und 2 bzw 1 und 2+6. Signifikante Unterschiede ergaben sich aber im Vergleich mit Gruppe 3. Hier war die ÜZ gegenüber den Gruppen 1,2,6 und 2+6 signifikant verkürzt ($p \leq 0,01$).

2.2. Gewicht

Das Gewicht der Tiere wurde zu Beginn des Versuches (G.v.Inj.), während des Versuches und beim Tod (G TuM) registriert. Anschließend wurde der Tumor abpräpariert und gewogen (G Tu). Die Mäuse der Gruppe 6 waren zu Beginn des Ver-

Tabelle 1

Überlebenszeiten aller Mäuse in Tagen

Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 6	
(n = 20)	ÜZ	(n = 21)	ÜZ	(n = 7)	ÜZ	(n = 9)	ÜZ
1	56	1	23	1	14	1	30
2	12	2	21	2	15	2	41
3	44	3	56	3		3	52
4	40	4	33	4	36	4	27
5	40	5	26	5	19	5	27
6	39	6	31	6	12	6	28
7	32	7	40	7	16	7	28
8	19	8	48			8	39
9	52	9	44			9	55
10	52	10	23				
11	20	11	28				
12	40	12	30				
13	46	13	34				
14	38	14	34				
15	33	15	41				
16	34	16	51				
17	41	17	21				
18	16	18	25				
19	18	19	35				
20	39	20	39				
		21	42				

suches Älter und schwerer als in den anderen Gruppen. Aus den drei obengenannten Meßgrößen werden außerdem $dG\ M = G\ TuM - G\ Tu$ und $dG \approx G\ TuM - G.v.Inj.$ errechnet; $dG\ M$ entspricht damit dem Gewicht der Maus post mortem nach Abpräparation des Tumors und dG entspricht der Gewichtszunahme vom Tag der intramuskulären Injektion bis zum Tod. Die Einzelwerte sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Mittelwerte der oben erwähnten Gewichte sind in Tabelle 3 zu finden.

Der Vergleich der Gewichte der Tumormäuse der Gruppe 1 mit Normalmäusen der Gruppe 4, und ebenso der Tumormäuse der Gruppe 2, 3. u. 6 mit Normalmäusen der Gruppe 5 zeigt folgendes: Zwischen den $G\ Tu$ der Gruppen 1, 2 und 1, 6 ergab sich kein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Rang-Test.

Die Gewichtszunahme dG ist nur signifikant mit $p \leq 0,01$ im Wilcoxon-Rang-Test beim Vergleich der Gruppe 1 mit Gruppe 6 bzw. Gruppe 3 nicht aber beim Vergleich der Gruppe 1 mit Gruppe 2. Der Gewichtsveränderung des Tumors $G\ Tu$ läuft die Gewichtszunahme dG parallel ($p \leq 0,05$) bei den Gruppen 1 und 2 nicht aber bei Gruppe 6. Bei Gruppe 6 fällt die nur geringe Gewichtszunahme, aber das hohe durchschnittliche $G\ Tu$ auf.

Tabelle 2

Registrierte und errechnete Gewichte aller behandelten und unbehandelten Mäuse in Gramm

Gruppe	Zahl d. Tiere	G.v.Inj.	G Tum	G Tu	dg M	dg
1	1	26	40	9	31	14
	2	26	26	4	22	0
	3	28	37	12	25	9
	4	27	34	10	24	7
	5	29	37	5	32	8
	6	32	40	13	27	8
	7	30	27	8	19	3
	8	26	29	2	27	3
	9	30	44	18	26	14
	10	30	37	16	21	7
	11	29	50	19	31	21
	12	30	36	4	22	6
	13	27	45	18	27	18
	14	30	40	10	30	10
	15	27	30	4	26	3
	16	23	30	9	21	7
	17	30	49	14	35	19
	18	30	35	2	35	5
	19	27	30	4	26	3
	20	31	38	9	29	7
2	1	30	20	4	16	+10
	2	27	29	3	26	10
	3	29	44	10	34	15
	4	25	38	12	26	17
	5	27	28	5	23	1
	6	30	27	6	21	1
	7	30	34	6	28	3
	8	28	42	16	26	14
	9	27	36	15	21	14
	10	25	39	3	31	14
	11	27	35	8	27	8
	12	26	30	7	27	4
	13	29	32	5	27	4
	14	30	38	6	32	3
	15	30	35	6	29	5
	16	28	50	19	31	22
	17	25	30	7	23	5
	18	27	30	6	24	3
	19	29	36	5	24	3
	20	27	40	14	30	13
	21	26	40	18	22	14

Gruppe	Zahl d. Tiere	G.v.Inj.	G Tum	G Tu	dg M	dg
3	1	34	35	5	30	1
	2	34	36	5	31	2
	3	34	37	18	19	3
	4	37	34	13	21	-3
	5	36	25	3	22	-11
	6	37	35	3	32	-2
	7	39	26	6	20	-13
4	1	40	41			1
	2	43	41			-2
	3	44	43			-1
	4	45	44			-1
	5	42	41			-1
	6	43	44			-1
	7	45	44			-1
	8	45	45			0
	9	45	45			0
	10	45	48			3
5	1	35	38			3
	2	40	42			2
	3	45	44			-1
	4	45	46			1
6	1	44	45	13	32	1
	2	43	45	11	34	2
	3	45	45	9	36	0
	4	40	42	18	24	2
	5	42	43	13	30	1
	6	45	49	14	35	4
	7	43	47	12	35	4
	8	45	55	7	48	10
	9	35	35	10	45	0

Tabelle 3

Mittelwerte der Gewichte von den Gruppen 1, 2, 3 u. 6
in Gramm.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 6
G.v.inj.	28,4	27,8	36	42,4
G Tuh	36,7	34,9	32,6	45,1
G Tu	8,5	9	7,6	11,9
dG	8,6	7,4	-3,3	2,6
dGM	26,8	26,1	23,6	33,2

Tabelle 4

Übersicht über die Verteilung der Lungen- und
Herzmetastasen der Gruppen 1, 2, 3, 6.

Gruppe	Lungenmetastasen	Herzmetastasen
1 n = 20	- = 0%	1
2 n = 21	5 = 50%	-
3 n = 7	1 = 14%	-
6 n = 9	8 = 89%	-

Nur in Gruppe 6 ergibt sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$, daß G.v.Inj. und dG M voneinander abhängen, ebenso für G Tu mit dG M. Für die Gruppen 1 und 2 trifft dies nicht zu.

Bei Gruppe 4 konnte keine Gewichtszunahme dG während des Versuchszeitraumes festgestellt werden. In Gruppe 5 nimmt das Gewicht dG um 1,5 g zu. Diese Gewichtszunahme dG zwischen Gruppe 4 und 5 ist nicht signifikant verschieden.

2.3. Abhängigkeit der Überlebenszeit vom Gewicht

In Gruppe 1 und 2 nimmt mit zunehmender Überlebenszeit auch das Gewicht der Tumormäuse zu ($p \leq 0,05$), nicht jedoch bei den Gruppen 3 und 6 (Abb. 4).

Eine enge Beziehung zwischen Überlebenszeit und Tumorgewicht G Tu besteht in allen Gruppen mit tumortragenden Mäusen ($p \leq 0,01$; Abb. 5).

Nur in Gruppe 1 steigt mit der Überlebenszeit auch die Gewichtszunahme dG signifikant ($p \leq 0,05$).

2.4. Metastasen

In Gruppe 1 hatte nur ein Tier eine Metastase am Herz entwickelt, die ÜZ dieses Tieres betrug deshalb nur 12 Tage.

In Gruppe 2 trugen 5 Tiere Lungenmetastasen.

Abb. 4

Abhängigkeit des Gewichts der Tumormaus (G TuM)
von der Überlebenszeit in Gruppe 2

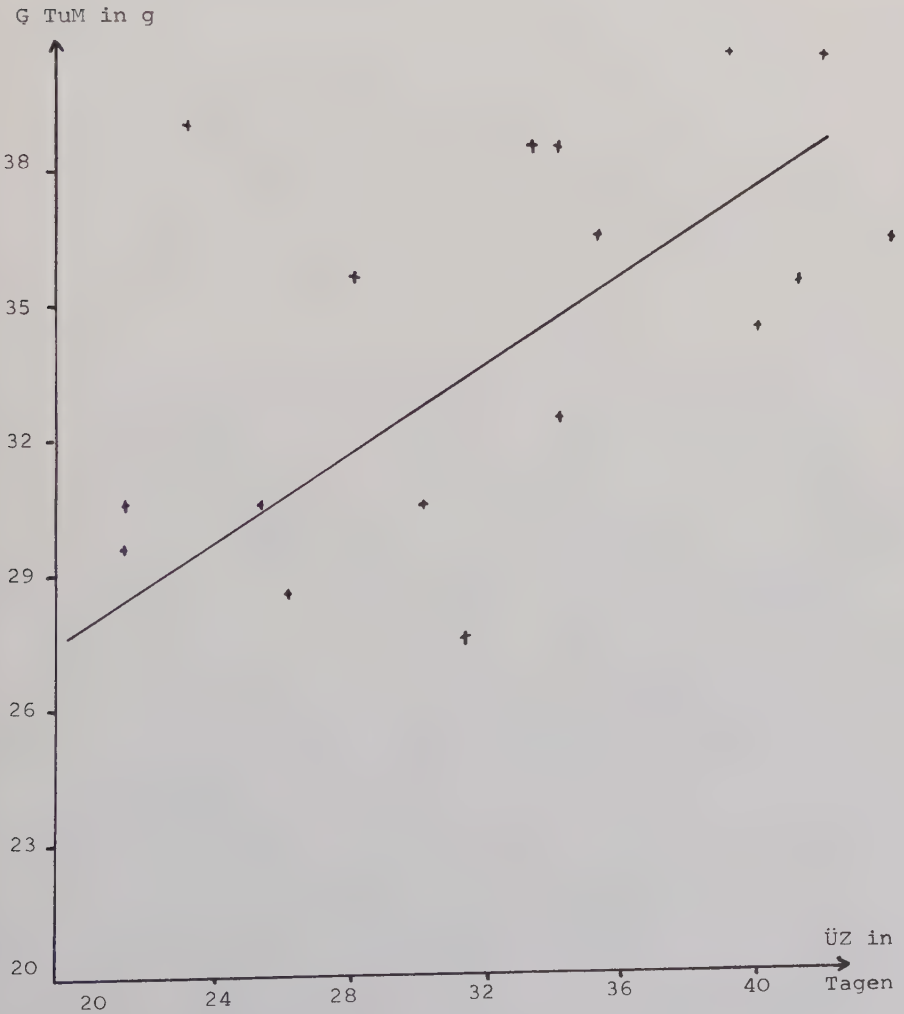
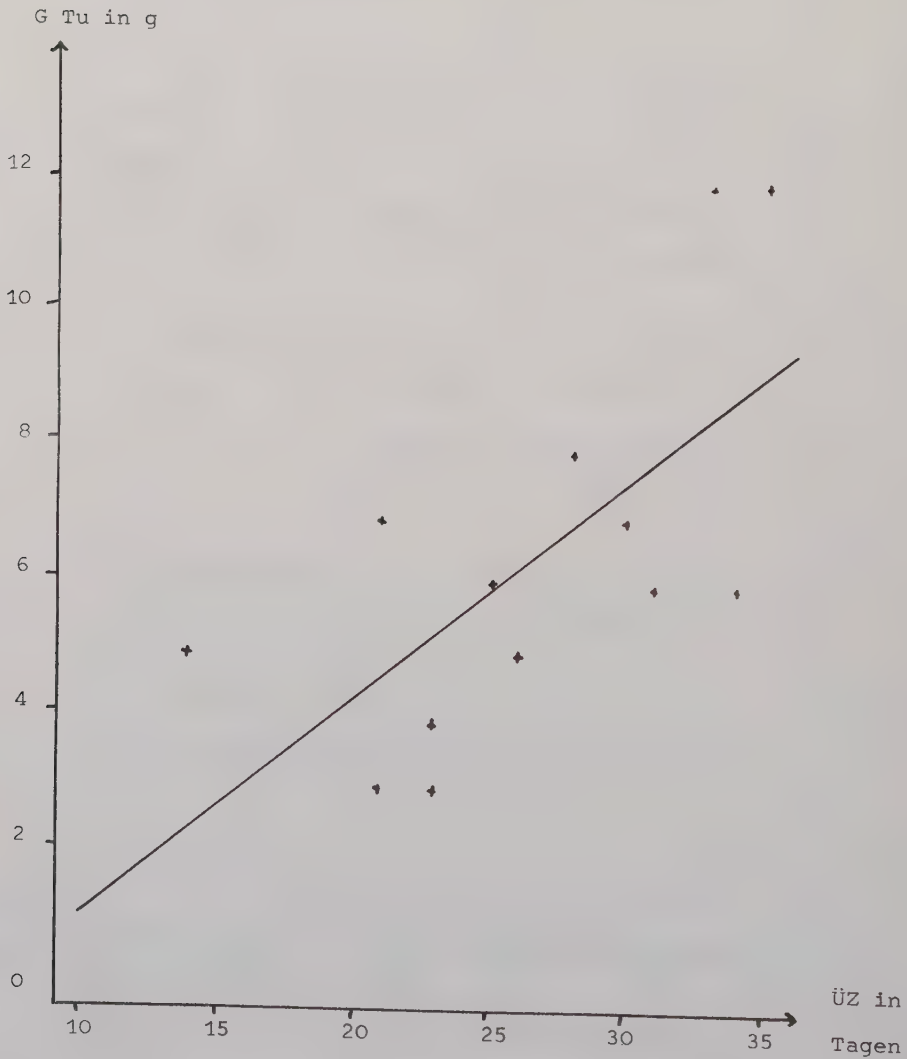


Abb. 5

Abhängigkeit des Gewichts des Tumors (G Tu)
von der Überlebenszeit in Gruppe 2



In Gruppe 3 trug 1 Tier Lungenmetastasen.

In Gruppe 6 wiesen 8 Mäuse Lungenmetastasen und eines davon Lebermetastasen auf.

Vergleicht man die Gruppen 1 und 2, so fällt auf, daß bei annähernd gleich vielen Tieren pro Gruppe in der unbehandelten Gruppe 2 25 % Lungenmetastasen zeigten, während in der behandelten Gruppe 1 kein Tier Lungenmetastasen aufwies. In Gruppe 6 hatten relativ noch mehr Mäuse (89 %) Lungenmetastasen (Tab. 4).

2.5. Tumorabhängige Komplikationen

In Gruppe 1 entwickelten sich sehr häufig Ileus und Harnwegsobstruktion (ca. 50%) infolge Verlegung des Darm- bzw. Urethrallumens. 4 Tiere zeigten Fibrinablagerungen im Bauchraum als Ausdruck einer Peritonitis (davon 3 Tiere mit Ascites). Von den ersten 10 Tieren der Gruppe 2 bekamen sechs einen Ileus und drei eine Harnwegsobstruktion, ein Tier erlitt einen Tumoreinbruch ins Rückenmark. Ein Tier zeigte Fibrinablagerungen im Bauchraum.

Bei 5 Tieren der Gruppe 3 hatte der Tumor die Trachea, bei 4 Tieren per continuitatem das Mediastinum infiltriert (Tab. 5).

Tabelle 5

Aufstellung der Folgen und Komplikationen der Tumoren

Gruppe	Ort der Tumorzell-injektion	Zahl der Ileus	Tiere mit Harnwegs-obstruktion	Infiltr. des Rückenmarks	Trachea-obstruktion	Infiltr. ins Mediastinum
1 (n = 20)	gluteal bzw. paravertebral	11	11	2	-	-
2 (n = 10)	gluteal bzw. paravertebral	6	3	1	-	-
3 (n = 7)	vordere Extremität bzw. Schulter	-	-	1	5	4

2.6. Fibrinolyse

Fibrinolyse bedeutet die Auflösung von quervernetztem Fibrin, entweder über Plasminogenaktivatoren, wie Urokinase, Streptokinase und Gewebsaktivator - auch spezifische Fibrinolyse - oder über proteolytische Aktivität, auch unspezifische Fibrinolyse genannt.

Plasminogenaktivatoren befinden sich normalerweise gewebständig in zahlreichen Geweben.

Durch ihre Wirkung entsteht aus Plasminogen das aktive Plasmin, welches Fibrin spaltet und Fibrinogenspaltprodukte entstehen lässt, die ihrerseits eine weitere Fibrinbildung hemmen. Hauptquelle der unspezifischen proteolytischen Aktivität sind zerfallene Leukozyten.

Die bakteriell bedingte Fibrinolyse wird meist unspezifisch über bakterielle Proteasen, oder spezifisch über Streptokinase vermittelt.

2.6.1. Fibrinolytische Aktivität der Gewebe in den verschiedenen Gruppen

Da die fibrinolytische Aktivität mehrerer Gewebe auf vier verschiedenen Platten gemessen wurde, soll die nachfolgende Tabelle (Tab. 6) eine Übersicht über die vorgenommenen Messungen geben.

Als Anschauungsmaterial der lysierten Flächen mögen beigefügte Fotos dienen (Abb. 6).

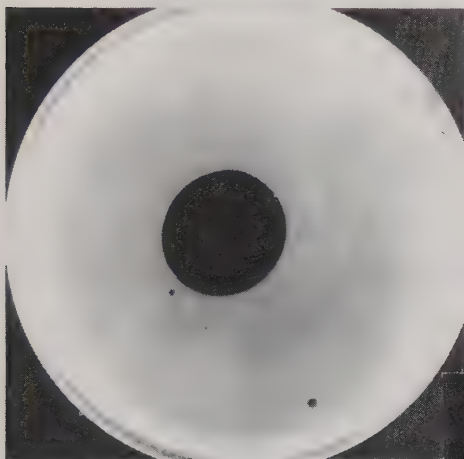
T a b e l l e 6

Übersicht über die vorgenommenen Messungen

Gewebe	Gruppe	Platten			
		A	B	C	D
Tumoren	1	20	4	1	
Tumoren	2	10	9	9	9
Tumoren	3	7	7	7	7
Lungen	1	19	4		
Lungen	2	9	2		
Lungen	3	5	2	1	
Lungen	4	10	10		
Lungen	5	4	4		
Muskel	4	10	10		
Muskel	5	4	4		

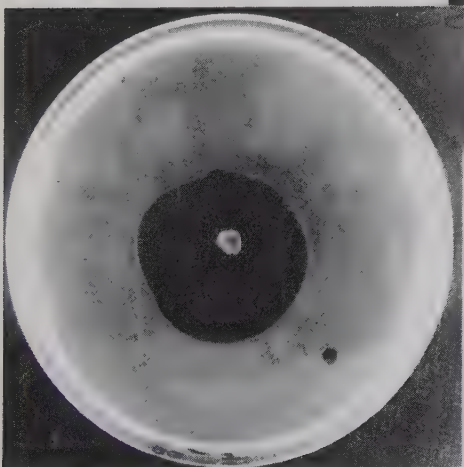
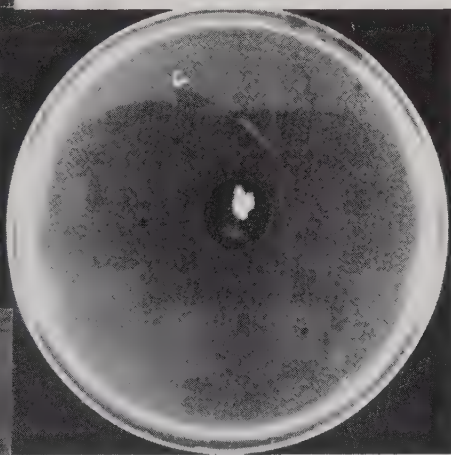
Abb. 6

Lysefläche auf den Fibrinplatten durch Strepto-
kinase, Tumor und Lunge



Lyse durch 25 IE
Streptokinase
auf Platte A
Lysefläche 450 mm^2

Lyse durch 10 mg
Tumorgewebe auf
Platte A
Lysefläche 150 mm^2



Lyse durch 10 mg
Lungengewebe
auf Platte A
Lysefläche 700 mm^2

2.6.1.1. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 1

Getestet wurden die fibrinolytischen Aktivitäten der Tumoren sowie die der dazugehörigen Lungen auf den Platten A und B (s. Tab. 7). Von 20 Tumoren zeigten 4 eine fibrinolytische Aktivität auf Platte A, 16 Tumoren zeigten keine Aktivität. Die 4 Tumoren mit fibrinolytischer Aktivität wurden auf Platte B getestet, woraufhin nur noch ein Tumor eine Lyse erzeugte.

Die durchschnittliche Lysefläche aller 20 Tumoren auf Platte A betrug $2,66 \text{ mm}^2$, wobei Tumor 4 mit $24,5 \text{ mm}^2$ den größten Lysehof erzeugte. Die durchschnittliche Lysefläche der 4 Tumoren auf Platte A betrug $13,3 \text{ mm}^2$.

Von 19 Lungen zeigten 13 eine fibrinolytische Aktivität auf Platte A. Von 5 Lungengewebsproben auf Platte B zeigte eine Lunge fibrinolytische Aktivität. Die durchschnittliche Lysefläche aller 19 Lungen auf Platte A betrug $23,8 \text{ mm}^2$, die der 13 Lungen mit fibrinolytischer Aktivität $28,4 \text{ mm}^2$. Die Lunge, die auf Platte B eine Lyse erzeugte, produzierte auch auf Platte A die größte Lyse.

2.6.1.2. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 2

Von Gruppe 2 wurden die Tumoren und Lungen der ersten 10 Mäuse für die Messung der fibrino-

Tabelle 7

Lyseflächen der Tumoren und Lungen der Gruppe 1
mit AlChA-Therapie in mm^2

Platte	A	B		A	B	C
Tumoren			Lungen			
1	-		1			
2	-		2	23,7		
3	-		3	-	-	
4	24,5	18,5	4	58	9,3	
5	-		5	-		
6	-		6	-		
7	-		7	32,8		
8	-		8	32,5		
9	-		9	-		
10	11,8	-	10	39,3	-	
11	-		11	28,8		
12	7	-	12	21,9		
13	-		13	21,4		
14	-		14	29		
15	-		15	11,3		
16	-		16	-		
17	-		17	6,3		
18	-		18	55,5	-	
19	10	-	19	43	-	
20	-		20	-		

lytischen Aktivität verwendet .

Alle 10 Tumoren zeigten eine fibrinolytische Aktivität auf Platte A, während auf Platte B von 9 Tumoren nur 4 eine Fibrinolyseaktivität besaßen. Die Testung auf Platte C zeigte bei 8 von 9 Tumoren fibrinolytische Aktivität.

Die durchschnittliche Lysefläche betrug

auf Platte A 12,4 mm²/mg Gewebe

auf Platte B 3,6 mm²/mg Gewebe

auf Platte C 11,0 mm²/mg Gewebe

auf Platte D 0,6 mm²/mg Gewebe.

7 der 9 getesteten Lungen zeigten auf Platte A eine Fibrinolyse. Auf Platte B wurden nur 2 Lungen getestet, die auf Platte A Fibrinolyse bewirkt hatten. Beide Lungen waren auf Platte B negativ. Die durchschnittliche Lysefläche auf Platte A betrug 30,3 mm²/mg Gewebe. Eine Aufstellung der Größe der Lyseflächen der einzelnen Tumoren und Lungen der Gruppe 2 zeigt Tabelle 8.

2.6.1.3. Fibrinolytische Aktivität der Gruppe 3

Alle 7 Tumoren der Gruppe 3 wurden auf Platte A getestet und zeigten alle eine Fibrinolyseaktivität. Auf Platte B konnten nur 4 von 7 Tumoren Lysehöfe erzeugen, während auf Platte C wieder alle 7 Tumoren Fibrinolyse bewirkten. Auf Platte D zeigten wiederum nur die gleichen 4 Tumoren wie

auf Platte B Fibrinolyse. Die durchschnittlichen Lyseflächen betragen auf Platte A $32,1 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$
 auf Platte B $17,5 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$
 auf Platte C $14,5 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$
 auf Platte D $6,0 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$.

auf Platte A wurden die Lungen von 5 Tumormäusen geprüft. Drei Lungen waren fibrinolytisch aktiv, zwei nicht. Die durchschnittliche Lyse auf Platte A betrug $48,5 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$. Als Übersicht über die Lyseflächen diene Tabelle 9.

2.6.1.4. Fibrinolytischen Aktivität der Gruppe 4

Bei 10 Mäusen wurden Muskelgewebe und Lunge untersucht. Dabei entstand auf Platte A und B keine Fibrinolyse durch Muskelgewebe.

Alle 10 Lungen zeigten auf Platte A Fibrinolyseaktivität, auf Platte B jedoch nicht. Die durchschnittliche Lysefläche auf Platte A betrug $27,8 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$.

2.6.1.5. Fibrinolytischen Aktivität der

Gruppe 5

Wie in Gruppe 4 besaßen alle 4 Muskelgewebsproben keine Fibrinolyseaktivität. Jedoch wiesen alle vier Lungen auf Platte A eine fibrinolytischen Aktivität, auf Platte B keine auf. Die durchschnittliche Lysefläche auf Platte A betrug $10,7 \text{ mm}^2/\text{mg Gewebe}$. Einzelwerte der Gruppen 4 und 5 sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

T a b e l l e 8

Lyseflächen der Tumoren und Lungen der unbehandelten Gruppe 2 in mm^2/mg Gewebe

Platte	A	B	C	D	A	B
Gewebe	Tumoren				Lungen	
1	8	-	24,4	5,8	31,3	-
2	29,2	12	26	-	-	
3	18,4	6	8,5	-		
4	7,7	-	6,4	-	-	
5	20	-	-	-	44,3	
6	10	-	9,1	-	50	
7	8,6	6	7,3	-	47,1	
8	8	8	8	-	62,5	
9	6,6				8,9	-
10	7	-	10	-	28,6	

T a b e l l e 9

Lyseflächen der Tumoren und Lungen der unbehandelten Gruppe 3 in mm^2/mg Gewebe

Platte	A	B	C	D	A
Gewebe	Tumoren				Lungen
1	12,6	-	7	-	-
2	15,6	-	3,6	-	-
3	32	-	13,6	-	
4	94	85	23	10	50
5	24,4	13,6	17,8	3	70
6	27	12	14	12,5	
7	19,3	12	19,6	17	26,5

3. Diskussion

3.1. Diskussion zur Methode

3.1.1. Tierversuche

In der Gruppe 1 und 2 befanden sich bezüglich Injektionsort, Alter und Gewicht identische Mäuse, so daß man sehr gut den Einfluß der AMCHA erkennen kann. Gruppe 6 ist bis auf das höhere Gewicht vor der Carcinomzellinjektion mit Gruppe 2 identisch.

Gruppe 4 und 5 dienten dazu, die Wirkung der AMCHA in normalen Tieren zu überprüfen.

Die hohe Zahl der Carcinomzellen für die Injektion wurde gewählt, damit sich bei möglichst allen Mäusen ein solider Tumor bildete. Als Ort der intramuskulären Injektion wurde die gluteale Region gewählt, in der Meinung, damit möglichst wenig Komplikationen - bedingt durch den Ort der Injektion - zu erhalten. Vergleichsweise dazu wurden der Gruppe 3 an der vorderen Extremität/Schulterbereich Tumorzellen intramuskulär injiziert.

Der Zeitpunkt des Therapiebeginns wurde auf den Beginn der klinischen Symptome (Tastbarkeit des Tumors, bzw Hinken der Tiere) festgelegt, um die therapeutische und nicht die prophylaktische Wirkung der AMCHA zu prüfen.

3.1.2. Fibrinplattentest

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß verschiedene Gewebe auf die Fibrinschicht gelegt werden, fibrinolytisch oder proteolytische wirksame Enzyme austreten und eine Lyse der Fibrinschicht herbeiführen; die Lysefläche stellt ein Maß für die plasminbedingte oder sonstige proteolytische Aktivität dar. Mit der plasminogenreichen Platte (2,7 %) kann man die durch Plasminogenaktivatoren hervorgerufene Lyse messen. Mit der plasminogenarmen Platte (<1%) wird die Lyse gemessen, die von anderen Enzymen mit proteolytischer Wirkung stammt. Die Zugabe des Breitbandantibiotikums Gentamycin und des Bakteriostatikums Natriumazid verhindert die Vermehrung von Bakterien, kann aber bereits vorhandene Proteasen nicht hemmen. Bei jeder neuen Herstellung einer Fibrinplattenserie wurden Messungen mit 10 IE Streptokinase durchgeführt, um gleichbleibende Qualität der Fibrinplatten zu gewährleisten.

3.2. Diskussion der Ergebnisse

Im Wilcoxon-Rang-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied der Überlebenszeiten zwischen der behandelten Gruppe 1 und den unbehandelten Gruppen 2 und 6 bzw. 2+6.

Nur die Überlebenszeit in der Gruppe 3 war im Vergleich mit den Gruppen 2,6 und 2+6 signifikant verkürzt ($p \leq 0,01$). Das bedeutet, daß die Therapie mit AMCHA weder eine Verlängerung noch eine Verkürzung der Lebenserwartung mit sich brachte. Aus der Kurve der Absterberate (Abb. 3) zeigt der parallele Verlauf zwischen den Gruppen 1 und 2, daß AMCHA die Überlebenszeiten nicht beeinflusst. Eine toxische Wirkung der AMCHA in dieser Dosierung läßt sich wahrscheinlich ausschließen, weil sich weder die Überlebenszeiten, noch die Gewichte zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren wesentlich unterscheiden.

In allen Gruppen ergibt sich eine große Schwankungsbreite der Überlebenszeit (siehe Abb. 2). Sie scheint deshalb nicht von der AMCHA-Therapie abhängig zu sein, sondern ist vielmehr als biologische Schwankungsbreite einer Population zu verstehen.

Die durchschnittliche, kürzeste und längste Überlebenszeit waren in Gruppe 3 niedriger als

in Gruppe 1 oder 2 (siehe Abb. 1). Betrachtet man die vermutlichen Toderursachen, so stellt man fest, daß die Tumoren andere Strukturen beeinträchtigen als in Gruppe 1 und 2 (Tab. 5). Abhängig von der Lokalisation der Carcinomzellinjektion werden nur in Gruppe 3 die Luftröhren infiltriert, was für das schnellere Sterben der Mäuse in dieser Gruppe verantwortlich zu sein scheint.

Der Vergleich der Kontrollgruppen 4 und 5 sollte zeigen, ob AMCHA per se in 3%iger Verdünnung im Trinkwasser einen Einfluß auf Gewicht und Überlebenszeit hat. Wie schon bei der ÜZ, hat AMCHA in der angewandten Konzentration auf die Gewichtszunahme keinerlei Wirkung, so daß man davon ausgehen kann, daß AMCHA auch nicht die Gewichte der Tumormäuse über einen anderen Mechanismus als antifibrinolytisch, so z.B. toxisch hemmend oder fördernd beeinflusst. Vergleicht man die Tumorgewichte zwischen den Gruppen 1,2; 1,3 und 1,6 , so liegen sie in allen vier Gruppen in derselben Größenordnung. Auch im Wilcoxon-Rang-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die Wirkung der AMCHA auf G Tu lässt sich nicht beweisen.

Die Gewichtszunahme dG in Gruppe 1 ergibt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu

Gruppe 2, obwohl sie bei den unbehandelten Tieren der Gruppe 2 geringer ist als in Gruppe 1. Die Gewichtszunahmen dG der Gruppe 3 und 6 sind im Vergleich mit dG der Gruppe 1 signifikant niedriger ($p \leq 0,01$). Hier ist auch das G Tu mit dG nicht korreliert wie in Gruppe 1 und 2 ($p \leq 0,01$). Die Gewichte der Mäuse nach Tumorentfernung dG M bleiben - verglichen mit G.v.I. - in den Gruppen 1 und 2 etwa gleich, während bei Gruppe 6 dG M mit G.v.I. in enger Beziehung derart steht, daß dG M deutlich niedriger ist als G.v.I. ($P \leq 0,05$). Während die Mäuse in den Gruppen 1 und 2 ihr Gewicht ohne Tumor dG M - verglichen mit G.v.I. - halten, weil sie alle Wachstumsreserven, die sie als junge wachsende Mäuse haben, für das Tumorstadium aufbrauchen und nicht eigene Substanz abbauen müssen, geht in Gruppe 3 und 6 das Tumorstadium zu Lasten des dG M ($P \leq 0,05$), was man als eine auch beim Menschen beobachtete Tumorkachexie deuten könnte.

Warum nun dG nur bei Gruppe 6 (ausgewachsene Tiere) so gering ist, und nicht bei den Gruppen 1 und 2, könnte sich daraus erklären, daß die Mäuse der Gruppe 1 und 2 sich noch im Wachstum befinden (das G.v.I. ist deutlich geringer als in Gruppe 6) und deshalb das Tumorstadium G Tu

besser ausgleichen können als in Gruppe 6; dies spiegelt sich in Korrelation von dG M zu G.v.I. wider.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das Therapeutikum AMCHA keinen Einfluss auf das Tumorgewicht (G Tu), das Gewicht der Maus nach Abpräparation des Tumors (dG M) und die Differenz des Gewichtes der Tumormaus nach dem Tod abzüglich dem Gewicht vor der Carcinomzellinjektion (dG) zeigt.

Die Unterschiede der Gewichtszunahme vom Tag der intramuskulären Injektion bis ~~zum~~ Tod (dG) zwischen den Gruppen 1 und 6 lassen sich aus den verschiedenen Altern und Gewichten vor Versuchsbeginn erklären und stellen keine Wirkung der AMCHA dar.

Das Gewicht der Tumormäuse G TuM hängt in den Gruppen 1 und 2 linear und direkt von der Überlebenszeit ab; das heißt, daß die AMCHA keinen Einfluß auf das Gewicht der Tumormaus (G TuM) zu nehmen vermag.

Bei den Gruppen 3 und 6 besteht dieser lineare Zusammenhang nicht, was wahrscheinlich bei Gruppe 3 mit dem Ort der Tumorzellinjektion und der damit verbundenen Tumorfolgen in Zusammenhang steht. Bei Gruppe 6 erklärt sich das aus dem höheren Ausgangsgewicht G.v.I. der

tumortragenden Mäuse.

Ebenso eindeutig weist die hohe Korrelation zwischen ÜZ und G Tu darauf hin, daß die AMCHA auf das Gewicht des Tumors (G Tu) keinen Einfluß hat.

Bei den bis auf die Therapie identischen Gruppen 1 und 2 zeigt sich deutlich, daß die AMCHA die Zahl der von Lungenmetastasen betroffenen Mäuse reduziert. (s. Tab. 4)

AMCHA scheint eine Schutzwirkung gegen Metastasenentwicklung zu haben. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Agostino & Clifton (3), wo mit antikoagulativer und fibrinolytischer Behandlung die Metastasen reduziert werden konnten.

Zwar hemmt AMCHA einerseits die Bildung von Plasmin und fördert damit möglicherweise die Adhäsion von Carcinomzellen ans Endothel der Lunge, andererseits hat es aber möglicherweise einen hemmenden Effekt auf die Metastasenentwicklung, indem es die lymphogene und hämatogene Ausschwemmung der Carcinomzellen erschwert, und zwar via vermehrter Thrombosierung und Fibrinbildung um den Tumor.

Anhand der kurzen Überlebenszeit der Mäuse in Gruppe 3 lässt sich erklären, daß hier nur eine Maus Lungenmetastasen aufwies.

Die bei den obduzierten Tieren beobachteten Komplikationen resultierten meist als direkte, gelegentlich auch als indirekte Tumorfolgen und sind wahrscheinlich oft die unmittelbare Todesursache. Bei den Mäusen in den Gruppen 1 und 2 überwiegen die abdominalen und pelvinen Komplikationen, wie Ileus, Harnwegsobstruktion, Ascites und Peritonitis, sowie die Infiltration ins Rückenmark. Bei den Mäusen in Gruppe 3 treten die mediastinalen Komplikationen wie Tracheainfiltration und Einwachsen ins Mediastinum in den Vordergrund. Die mediastinalen Komplikationen scheinen sich ungünstiger als die abdominalen auf die Überlebenszeiten auszuwirken.

Wie man in den Gruppen 2 und 3 sehen kann (s. Tab. 11), ändert sich bei Testung auf Platte B im Vergleich zu Platte A sowohl die Zahl der Tumoren, die noch fibrinolysieren können, als auch die durchschnittliche Lysefläche, und zwar sinken beide Parameter bei der Testung auf Platte B. Dasselbe gilt sinngemäß für die Gruppen 4 und 5 (s. Tab. 11). Fasst man die Gruppen 2 und 3 zusammen und vergleicht die Zahl der Tumoren mit bzw. ohne fibrinolytische Aktivität auf Platte A bzw. B in einer Vierfeldertafel mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes,

so ergibt sich, daß die Tumoren auf Platte A signifikant mehr Lysen geben als auf Platte B ($p \leq 0,001$). Dieses Ansprechen der Tumoren auf die AMCHA in Platte B zeigt, daß die Lyse, die der Tumor erzeugt, nicht bakteriell über unspezifische Proteolyse erfolgt. Es besteht kein Grund anzunehmen, daß sich in den Lungen, Tumoren und Geweben oder auf den Platten streptokinaseproduzierende Bakterien befanden. Die Tumoren der Gruppe 3 zeigten auf Platte C durchschnittlich viel weniger fibrinolytische Aktivität als auf Platte A und etwas weniger als auf Platte B. Auf Platte D war die Zahl der Tumoren mit fibrinolytischer Aktivität als auch deren Lysefläche reduziert (s. Tab. 11). Diese Befunde sprechen gegen eine proteolytische Fibrinolyse oder direkte Plasminwirkung durch Bakterienverunreinigung. Außerdem enthielten alle Platten Gentamycin und NaN_3 , was die Vermehrung von Bakterien verhinderte. Da das Testgewebe aus den zentralen Anteilen des Tumors entnommen wurde, ist es unwahrscheinlich, daß die Proben bakteriell besiedelt worden waren.

Am Vergleich der fibrinolytischen Aktivitäten der Lungen von Gruppe 4 mit Gruppe 5 kann man die Wirksamkeit der Therapie mit 3%iger AMCHA-Lösung im normalen nicht tumortragenden Or-

ganismus der verwendeten Mäuse ablesen. Dabei ergibt sich eine Reduktion der Lysefläche um $17,1 \text{ mm}^2/\text{mg}$ auf $10,7 \text{ mm}^2/\text{mg}$ Lungengewebe bei der mit AMCHA behandelten Gruppe 5. Im Wilcoxon-Rang-Test ist dieser Unterschied der Lysefläche hoch signifikant ($p \leq 0,01$).

Jedoch reicht die AMCHA in dieser Dosierung nicht aus die Fibrinolyse vollständig zu unterdrücken.

Die durchgeführten Messungen der fibrinolytischen Aktivität waren negativ, was bedeutet, daß das Muskelgewebe dieser Mäuse keine fibrinolytische Aktivität besaß.

Die Frage nach der Art der Fibrinolyse oder auch Proteolyse des Tumorgewebes lässt sich dadurch beantworten, daß man das Tumorgewebe auf einer Platte mit viel und einer mit möglichst wenig Plasminogengehalt testet, bzw. die vorhandene indirekte Fibrinolyse mit AMCHA in der Platte hemmt. Deshalb wurden die Tumoren der Gruppen 2 und 3 auf den Platten A, B und C getestet. Bei Gruppe 1, die bereits in vivo oral AMCHA zugeführt bekam, zeigte sich deutlich die reduzierende Wirkung der AMCHA auf die Fibrinolyse (s. Tab. 11). Beim Vergleich der fibrinolytischen Aktivität auf Platte B der Gruppe 2 mit Gruppe 3 gewinnt man den Eindruck, daß

die Tumoren unbehandelter Mäuse eine Kombination von direkter und indirekter Fibrinolyse zu besitzen scheinen, mit von Tumor zu Tumor wechselnder Dominanz der Fibrinolyseart. So reduziert sich in beiden Gruppen die Zahl der Tumoren mit fibrinolytischer Aktivität auf Platte B um etwa die Hälfte, woraus man die Schluß ziehen kann, daß die eine Hälfte über unspezifische Proteolyse, die andere Hälfte über die Plasminogenaktivierung die Fibrinplatten lysiert. Die direkte Fibrinolyse geht möglicherweise über die Bildung eines unspezifischen proteolytischen Enzyms, die indirekte Fibrinolyse über die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch ein vom Tumorgewebe produziertes streptokinaseähnliches Enzym. In Gruppe 2 haben auf Platte C fast alle, nämlich 8 von 9 Tumoren fibrinolytische Aktivität. Die durchschnittliche Fibrinolysefläche ist fast identisch mit der auf Platte A. Die Tumoren der Gruppe 3 sprechen ebenfalls auf AMCHA in Platte B und D mit einer Herabsetzung der Zahl der Tumoren, die lysieren, nicht aber der fibrinolytischen Aktivität der verbleibenden Tumoren an. Andererseits wird die fibrinolytische Aktivität auf Platte C gehemmt, aber alle Tumoren haben noch Fibrinolyseaktivität, was wiederum als Hinweis

dafür gelten mag, daß die Fibrinolyse sowohl über die Plasminogenaktivierung als auch über unspezifische Proteolyse erzeugt wird.

Kombiniert man eine Platte von Plasminogengehalt $\leq 1\%$ mit AMCHA, so reduziert sich die Zahl der Tumoren mit Fibrinolyseaktivität in Gruppe 2 drastisch, was ebenfalls für eine Kombination der direkten und indirekten Fibrinolyse spricht.

Vergleicht man die Zahlen der Tumoren mit fibrinolytischer Aktivität und die lysierten Flächen der Gruppe 1 mit der Gruppe 2 auf der Platte A, so stellt man fest, daß in Gruppe 1 vier von 20 Tumoren fibrinolytische Aktivität besaßen, während in Gruppe 2 alle 10 Tumoren fibrinolytisch aktiv waren. Dieser Unterschied ist statistisch gesichert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$. Durchschnittlich lysiert in Gruppe 1 ein mg Tumorgewebe $2,7 \text{ mm}^2$ Fläche, während in Gruppe 2 ein mg Tumorgewebe $12,4 \text{ mm}^2$ Fläche lysiert. Aber die Lyseflächen der vier fibrinolytisch aktiven Tumoren von Gruppe 1 liegen in derselben Größenordnung wie die der Gruppe 2. Der Vergleich der Lungen der Gruppen 1 und 2 zeigt keine deutliche und signifikante Verminderung der Lysefläche der Gruppe 1 mit

AMCHA-Therapie. Bei den Mäusen der Gruppe 5 ist die Wirkung der AMCHA ausgeprägter. Hier resultiert eine Reduktion um $17 \text{ mm}^2/\text{mg}$ Lungengewebe. Möglicherweise ist die Fibrinolyseaktivität in der Tumormaus auf einem höheren Niveau als in Normaltieren. Dies deutet darauf hin, daß die angewandte Dosierung der AMCHA möglicherweise zu gering war.

Im Prinzip ähnlich wie Gruppe 2 (bezüglich Platte B und C) verhält sich Gruppe 3, nur ist bei den Tumoren und Lungen dieser Gruppe die fibrinolytische Aktivität auf einem höheren Niveau. Da aber die Zahl der Tumoren der Gruppe 1, die fibrinolytische Aktivität entfalteteten, reduziert war - im Gegensatz zu den Gruppen 2 und 3 - scheint AMCHA bei den Tumoren, die mehr über indirekte Fibrinolyse arbeiten, antifibrinolytisch wirksam zu sein. Zur Übersicht über die fibrinolytischen Aktivitäten aller Tumoren und Lungen siehe Tabelle 11.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen:

Die Therapie mit AMCHA konnte die fibrinolytische Aktivität im Tumorgewebe mit vorwiegend direkter fibrinolytischer Aktivität und in den dazugehörigen Lungen nicht signifikant senken, während die Fibrinolyseaktivität in Lungen von Normalmäusen signifikant reduziert wurde. In Tumoren mit mehr indirekter Fibrinolyse war die AMCHA therapeutisch wirksam und die Fibrinolyse wurde ganz verhindert.

T a b e l l e 11

Übersicht über die Zahl der fibrinolytisch
aktiven Tumoren und Lungen und über die
durchschnittliche Lysefläche auf den
verschiedenen Platten

Platte	Tumoren				Lungen	
	A	B	C	D	A	B
<u>Gruppe 1</u>						
Zahl der Lysen	4/20	1/4			13/19	1/5
durch- schnitt- liche Lyse ² in mm	2,66	4,8			23,8	1,9
<u>Gruppe 2</u>						
Zahl der Lysen	10/10	4/9	8/9	1/9	7/9	0/2
durch- schnitt- liche Lyse ² in mm	12,4	3,6	11	0,6	30,3	0
<u>Gruppe 3</u>						
Zahl der Lysen	7/7	4/7	7/7	4/7	3/5	
durch- schnitt- liche Lyse ² in mm	32,1	17,5	14	6	48,5	

T a b e l l e 11

Fortsetzung

Übersicht über die Zahl der fibrinolytisch
aktiven Tumoren und Lungen und über die
durchschnittliche Lysefläche auf den
verschiedenen Platten

Platte	Tumoren				Lungen	
	A	B	C	L	A	B
<u>Gruppe 4</u>						
Zahl der Lysen					10/10	0/10
durch- schnitt- liche Lyse ² in mm ²					27,8	0
<u>Gruppe 5</u>						
Zahl der Lysen					4/4	0/4
durch- schnitt- liche Lyse ² in mm ²					10,7	0

4. Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten und Interpretation

O'Meara (47) fand daß viele Carcinome die fibrinolytische Aktivität des Ausgangsgewebes verloren hatten. Ausgehend von dieser Beobachtung ist die Erklärung naheliegend, daß das sich bildende Fibrin um den Tumor für die Vaskularisierung und als Stroma des Tumors gebraucht wird.

Andere Forscher erhoben zum Teil gegensätzliche experimentelle Befunde (siehe Einleitung).

Deshalb war es notwendig zu untersuchen, welche fibrinolytische Aktivität das Ehrlich Ascites Carcinom bei den in diesem Versuch verwendeten Mäusen hat. G.B. Mider et al. (51) fanden erhöhte Fibrinogenspiegel im Blut während des Tumorwachstums. Demnach besteht zwischen diesen erhöhten Fibrinogenspiegeln und der von O'Meara und anderen Forschern beobachteten Fibrinablagerung um den Tumor ein Zusammenhang. Bale et al. fanden zusätzlich noch eine schnelle Abnahme von radioaktiv markierten Fibrinogen im Tumorgewebe und unter EACA-Behandlung eine Hemmung des Verbrauchs. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Fibrinablagerung eine Abwehrreaktion gegen das Tumor-

wachstum darstellt, und der Tumor deshalb darauf angewiesen ist, der Fibrinablagerung mit Hilfe seiner fibrinolytischen Aktivität entgegenzuwirken. Als therapeutisches Prinzip ergäbe sich daraus die antifibrinolytische Therapie. Die Rolle der Fibrinablagerung um den Tumor scheint noch nicht völlig geklärt; fest steht jedoch, daß sie die Tumorprogression beeinflußt.

Die Therapie mit dem Antifibrinolytikum AMCHA sollte nun zeigen, wie sich beim soliden EAC der Maus die Überlebenszeit, das Gewicht des Tumors, die fibrinolytische Aktivität in Tumoren und Lungen und die Metastasierungshäufigkeit verhält.

Bei den vorliegenden Versuchen stellten sich keine Unterschiede in der Überlebenszeit und dem Gewicht des Tumors heraus. Unterschiede ergaben sich in der Zahl der Lungenmetastasen. Bei der Testung der Tumoren und Lungen auf Fibrinolyseaktivität zeigte sich, daß AMCHA in der angewandten Konzentration die fibrinolytische Aktivität der Tumoren zu beeinflussen vermochte. So hatten von 20 behandelten Mäusen mit Tumoren nur noch 4 Tumoren eine Fibrinolyseaktivität, während bei 10 unbehandelten Mäusen alle 10 Tumoren fibrinolytisch aktiv

waren. Bei den dazugehörigen Lungen hatten in Gruppe 1 von 19 Lungen 13 fibrinolytische Aktivität und durchschnittliche Lyseflächen von $23,8 \text{ mm}^2/\text{mg}$ Gewebe. In Gruppe 2 hatten 7 von 9 Lungen fibrinolytische Aktivität und durchschnittliche Lyseflächen von $30,3 \text{ mm}^2/\text{mg}$ Gewebe. Die Ergebnisse zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied. Die Zahl der Lungenmetastasen war unter AMCHA-Therapie reduziert. Aussagen über die Überlebenszeit unter antifibrinolytischer Therapie aus anderen Studien liegen nicht vor. Das Tumorgewicht war nach den Ergebnissen verschiedener Autoren unter der Behandlung mit AMCHA gesunken. In dieser Untersuchung war es hingegen unverändert. Die Zahl der Metastasen des untersuchten Materials nahm unter AMCHA bei einem Teil der Autoren ab, bei einem anderen Teil zu. In der hier beschriebenen Versuchsreihe waren sie reduziert. Die Wirkung der AMCHA wurde an gesunden Mäusen getestet, deren Lungen nach Ende der Beobachtungszeit auf fibrinolytische Aktivität hin getestet wurden. Die AMCHA konnte in dieser Dosierung die Lysefläche um $17,1 \text{ mm}^2/\text{mg}$ Lungengewebe vermindern, jedoch nicht vollständig unterdrücken.

Die Wirkung der AMCHA bei den tumortragenden Mäusen kann man am besten im Vergleich der Fibrinolyseaktivität der Lungen von unbehandelten mit behandelten Mäusen messen. Im Chi-Quadrat-Test und Wilcoxon-Rang-Test ergab sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied, obwohl die Lysefläche der behandelten Gruppe durchschnittlich um $6,5 \text{ mm}^2$ pro mg Gewebe geringer war. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die AMCHA im Verhältnis zur starken fibrinolytischen Aktivität zu gering dosiert war, um eine signifikante Änderung hervorzurufen. Jedoch wurde von anderen Autoren z. T. die gleiche Menge und orale Applikationsart verwendet. Außerdem ließ sich in Gruppe 1 die Zahl der Tumoren mit fibrinolytischer Aktivität eindeutig senken, sodaß die AMCHA die entscheidende Wirkung, nämlich eine Senkung der Fibrinolyseaktivität der Tumoren, zeigte. Trotz dieser Senkung der fibrinolytischen Aktivität war die durchschnittliche Überlebenszeit und auch die Überlebenszeit der Mäuse mit Tumor ohne fibrinolytische Aktivität nicht verschieden von unbehandelten Mäusen. Ähnlich verhielt es sich mit den Gewichten, die ebenfalls dem Einfluß der AMCHA nicht zu unterliegen schienen.

Durch die unterdrückte Fibrinolyse wurde auch die Zahl der Lungenmetastasen reduziert. Dies geschah wahrscheinlich als Folge des den Tumor umgebenden Fibrins, welches nicht vollständig abgebaut werden konnte, und möglicherweise einer lokalen Hämostase, sodaß die Carcinomzellen nicht in größerer Zahl ausgeschwemmt werden konnten und in der Kapillarstrombahn der Lunge bei der nur gering reduzierten fibrinolytischen Aktivität auch nur schwer anhaften konnten.

Es lässt sich feststellen, daß die antifibrinolytische Therapie keine Wirkung auf Überlebenszeit und Gewicht des Tumors zu nehmen vermag, wohl aber auf die fibrinolytische Aktivität der Tumoren. Die Vorstellung, daß mit der Hemmung der fibrinolytischen Aktivität die Überlebenszeit zunehmen und das Tumorgewicht abnehmen würde, hat sich nicht bestätigt.

III. Zusammenfassung

1. Durch geeignete Testung konnte gezeigt werden, daß die Fibrinolyse nicht bakteriell, sondern durch Bildung tumoreigener Enzyme bedingt ist.
2. Die antifibrinolytische Wirkung der AMCHA konnte anhand der Lysen von Lungen gesunder Tiere, die unter AMCHA-Therapie standen bzw. keine Therapie hatten (Gruppen 4 und 5), gezeigt werden.
3. Die Überlebenszeit der Tiere mit Tumorzell-injektion in die vordere Extremität (Gruppe 3) war deutlich vermindert, was auf die Komplikationen infolge des Injektionsortes zurückgeführt wurde.
4. Abhängig vom Injektionsort, aber unabhängig von der Therapie mit AMCHA sind die sekundären Tumorfolgen, die sich aber verschieden auf die Überlebenszeit und damit auf die Gewichte auswirken.
5. Zwischen der Überlebenszeit und dem Gewicht der tumortragenden Maus (G TuM) besteht folgende Abhängigkeit: mit zunehmender Überlebenszeit nimmt auch das Gewicht zu. In

allen Gruppen mit tumortragenden Mäusen besteht eine enge Korrelation zwischen Überlebenszeit und Tumorgewicht.

6. Das Tumorgewicht G_{Tu} zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen war in allen Gruppen etwa gleich. Das Gesamtgewicht (G_{TuM}) am Absterbetag war in den Gruppen 1,2,4,5 und 6 gleich bzw. größer als das Gewicht am Tag der Tumorzellinjektion ($G.v.I.$). Das Gewicht der Maus nach Abpräparation des Tumors (dG_M) war in allen Gruppen 1,2,3 und 6 leicht bis stärker reduziert.

Die Gewichtszunahme pro Maus während der Versuchszeit (dG) war in den Gruppen 1 und 2 etwa gleich, in den Gruppen 3 und 6 deutlich reduziert, was bei Gruppe 3 auf die kurze Überlebenszeit und bei Gruppe 6 auf das höhere Gewicht bzw. Alter zurückgeführt wird.

7. Die AMCHA scheint eine protektive Wirkung auf die Metastasenbildung in der Lunge zu besitzen.
8. Die Tumoren scheinen zwei verschiedene Möglichkeiten der Fibrinolyseaktivierung zu besitzen:
 - a) eine direkte, über einen plasminähnlichen Wirkstoff des Tumors, die durch AMCHA nicht beeinflussbar ist, und

b) eine indirekte, über die Bildung von Plasminogenaktivator, wobei in einem Tumor eine Art überwiegt. So ließ sich in der mit AMCHA behandelten Gruppe 1 die Zahl der Tumoren mit fibrinolytischer Aktivität von 20 auf 4 senken, wohingegen in Gruppe 2 alle Tumoren fibrinolytische Aktivität haben.

Die Lungen der tumortragenden Mäuse in Gruppe 1 waren durch AMCHA in ihrer fibrinolytischen Aktivität supprimiert um ca. 20% gegenüber der unbehandelten Gruppe 2.

9. Die Überlebenszeit der therapierten Gruppe 1 und den unbehandelten Gruppen 2 und 6 ergab keinen signifikanten Unterschied.

IV. Literaturverzeichnis

- 1 M. Abercrombie, E.J.Ambrose: The Surface Properties of Cancer Cells
Cancer Research 22: 525, 1962
- 2 F.B.Ablondi, J.J.Hagan, M.Philips, E.C. de Renzo:
Inhibition of plasmin, trypsin and streptokinase
activated fibrinolytic system by ϵ -amino caproic acid
Arch. Biochem. et Biophys. 82: 153-160, 1959
- 3 D. Agostino, E.E. Cliffton: Decrease of metastases
of carcinosarcoma Walker 256 with irradiation and
heparin or fibrinolytic agents
Radiology 79: 848-855, 1962
- 4 D. Agostino, E.E. Cliffton: Anticoagulants and the
development of pulmonary metastases. Anticoagulant
effect on the Walker 256 carcinosarcoma in rats
Arch. Surgery 84: 449-453, 1962
- 5 O.K. Albrechtsen, O. Storm, M. Claasen: Fibrinolytic
activity in some human body fluids
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 10: 310-318, 1958
- 6 B. Astedt, I.Glifberg, W.Mattsson, C. Trope: Arrest
of Growth of Ovarian Tumor by Tranexamic Acid
Jama, Vol 238, No 2, 154-155, 1977
- 7 B.Astedt and L. Holmberg: Comparison between fibrino-
lytic activators from normal and malignant tissues
Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis
Raven Press New York, Vol. 3, 1978
- 8 B. Astedt, M. Pandolfi, I.M. Nilsson: Quantitation
of fibrinolytic agents released in tissue culture

- Experientia 27/3, 358-359, 1971
- 9 B.Astedt, L. Svanberg, I.M. Nilsson: Fibrin Degradation Products and Ovarian Tumours
British Medical Journal 4, 458-459, 1971
 - 10 T. Astrup and S. Müllertz: The Fibrin Plate Method for estimating Fibrinolytic Activity
Arch. Biochem. 40: 346-351, 1952
 - 11 W.Bale, I. Spar, R. Goodland 1962: Research directed toward the use of ^{131}I -labeled fibrinogen. In: Use of Radioisotopes in Animal Biology and the Medical Science 2, 271
 - 12 G. Björlin, M. Pandolfi, B. Astedt: Release of fibrinolytic activators from human tumours cultured in vitro
Experientia 28, 833-834, 1972
 - 13 B. Boeryd: Action of heparin and plasminogeninhibitor (EACA) on metastatic tumour spread in an isologous system
Acta path. et microbiol. scand. 65: 395-404, 1965
 - 14 B. Boeryd: Effect of heparin and plasminogen inhibitor (EACA) on intravenously injected ascites tumour cells
Acta path. et microbiol. scand. 68: 547-552, 1966
 - 15 B. Boeryd: Effect of heparin and plasminogen inhibitor (EACA) in brief and prolonged treatment on intravenously injected tumour cells
Acta path. et microbiol. scand. 68, 347-354, 1966
 - 16 B. Boeryd, B. Hagmar, G. Johnsson: Effect of heparin, eACA and guanethidine on intravenously induced melanoma B 16 metastases
Pathologia europaea, Vol 2, Nr. 2: 181-184, 1967

- 17 B. Boeryd, C.M. Rudenstam: Effect of heparin, plasminogen inhibitor (EACA) and trauma on tumour metastases
Acta path. et microbiol. scand. 69, 418-424, 1967
- 18 E.E. Cliffton: Fibrinolytic therapy for thromboembolic disease. Principles and practice
J. La St. med. Soc. 118: 309-319, 1966
- 19 E.E. Cliffton: Fibrinolysin treatment of cancer
Thrombosis, Vol 32, S. 387
- 20 E.E. Cliffton, D. Agostino: Factors affecting the development of metastatic cancer. Effect of alterations in clotting mechanism
Cancer 15: 276, 1962
- 21 E.E. Cliffton, D. Agostino: Effect of inhibitors of fibrinolytic enzymes on development of pulmonary metastases
J.Nat.Cancer Inst. 33: 753-763, 1964
- 22 E.E. Cliffton, D. Agostino: The effects of fibrin formation and alterations in the clotting mechanism on the development of metastases
Vasc. Disease 2: 43-52, 1965
- 23 E.E. Cliffton, C.E. Grossi: Fibrinolytic activity of human tumours as measured by the Fibrin Plate Method
Cancer 8: 1146-1154, 1955
- 24 E.E. Cliffton, C.E. Grossi: The rationale of Anti-coagulants in the treatment of Cancer
Journal of Medicine 5, 107-113, 1974

- 25 S. Dahl: Treatment of Cancer Patients with Infusions
of Plasmin
Oncologia 20: 35-38, 1966
- 26 J.F. Davidson, G.P. McNicol, G. Frank, T. Anderson,
A. Douglas: Plasminogen activator producing tumour
British Medical Journal 88-91, 1969
- 27 G.R. Fearnley: Fibrinolysis
William and Wilkins, Baltimore 146: 430-446, 1965
- 28 A. Fisher: Über die Wirkung des Heparin auf das
Wachstum von Gewebezellen in vitro
Protoplasma 26: 344, 1936
- 29 B. Fisher & E. Fisher: Anticoagulants and tumour-
cellodgement
Cancer Research 27, Part 1, 421-425, 1967
- 30 M. Fleischer and L. Loeb: On tissue fibrinolysis
Journal Biol. Chem. 21, 477, 1915
- 31 G. Gasic, T. Gasic, N. Galanti, T. Johnson, S. Murphy:
Platelet-tumour interactions in mice. The role of
platelets in the spread of malignant disease
J. Int. Cancer 11, 704 718, 1973
- 32 G. Gasic, P. Koch, B. Su, T. Gasic, S. Niewiarowski:
Thrombogenic activity of mouse and human tumours
Krebsforschung 86, 263-277, 1976
- 33 H. Gastpar: Stickiness of platelets and tumour
cells influenced by drugs
Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg) 42, 291-303, 1970
- 34 D.R. Grassetto: Effect of 6'6'dithiodinitronicacid
on the dissemination of Ehrlich Ascites Tumour
Nature, London 228, 282-283, 1970

- 35 B. Hagmar: Effect of heparin, coumarin and e-amino-caproic acid (EACA) on spontaneous metastasis formation
Path. europ. 4: 282-292, 1969
- 36 B. Hagmar, B. Boeryd: Effect of heparin, eACA and protamine on spontaneous metastasis formation from resectable tail tumours
Path. europ. 3, Nr. 4: 509-520, 1968
- 37 Hedner & Nilson: Clinical Experience with determination of fibrinogen degradation products
Acta med. Scand. 189, 1971
- 38 L.V. Heilbrunn & W.L. Wilson: The Effect of Heparin on Cell Division
Proc. Soc. Exp. Biol& Med. 70: 179, 1949
- 39 F. Haverkate and P. Brakman: Fibrin Plate Assay
Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis
Vol 1, Raven Press, New York, 1975
- 40 I. Kirikuta, C. Todorutiu, T. Muresian, R. Risca: Prophylaxis of metastases formation by unspecific immunological stimulation associated with heparino-therapy
Cancer, 1973
- 41 F. Koller: Zur Physiologie der Fibrinolyse
Thrombosis, Vol 32
- 42 M. Lewis, W. Cole: Experimental increase of lung metastases after operative trauma
Arch. Surg., Chicago 77: 621-626, 1958
- 43 S.M. Lippmann: The growth inhibitory action of heparin on the Ehrlich Ascites Tumour in mice
Cancer research 17, 11-14, 1957

- 44 A. Lisnell and J. Mellgren: Effect of heparin, protamine, dicoumarol, streptokinase and EACA on the growth of human cells in vitro
Acta path. et microbiol. scand. 57: 145, 1963
- 45 H. Ludwig: Antikoagulantien beim fortgeschrittenem Carzinom
Gynäkologe 7, 204, 1974
- 46 R. Marx: Wichtige klinisch-hämostaseologische Phänomene bei Malignomen In: Onkohämostaseologie, Febr.1975
Herausgeber: H. Gastpar, F. K. Schattauer Verlag, 1976
- 47 R.A.Q. O'Meara: Coagulative properties of cancers
Irish J. med. Sci. 394: 474- 479, 1958
- 48 R.A.Q. O'Meara: Fibrin formation and tumour growth
Thromb. Diath. Häorrh. Suppl. 28, 137
- 49 R.A.Q. O'Meara and R. Thornes: Some properties of cancer coagulative factor
Irish J. Med. Sci., 106- 112, 1961
- 50 R.C. Miller and A.S. Ketcham: The effect of heparin and warfarin on primary and metastatic tumours
Journal of Medicine 5, S. 23-31, 1974
- 51 G.B. Mider, E.L. Alling, J.J. Morton: The effect of neoplastic and allied diseases on the concentrations of the plasmaproteins
Cancer 3, 56, 1950
- 52 S. Okamoto, K. Kinjo, S. Oshiba, M. Mangyo, M. Shimizu, S. Sato, U. Okamoto: Behaviour of tissue activator and a series of potent inhibitors on fibrinolysis
Xth. congress of the International Society of Haematology, Stockholm, Sweden, Aug 30 - Sept 4, 1964

- 53 S. Oshiba and S. Okamoto: Influence of AMCHA on the activity of fibrinolysin (Plasmin)
Keio J. med. 11, 117-125, 1962
- 54 H.I. Peterson, I. Kjartansson, K.Korsan-Bengtson, C.M. Rudenstam, L. Zettergren: Fibrinolysis in human malignant tumours
Acta chir. scand 139, 219-223, 1973
- 55 H.I. Peterson: Experimental studies on fibrinolysis in growth and spread of tumour
Acta chir. scand. Suppl. 394, 1968
- 56 H.I. Peterson and B. Risberg: Experimental Studies on the effect of induced antifibrinolysis on per-operative tumour cell shedding
Zeitschrift für Krebsforschung und klin. Onkologie 86, 121-125, 1976
- 57 H.I. Peterson and C.M. Rudenstam: Effect of fibrinolytic and antifibrinolytic therapy on tumour growth and metastasis formation
Cancer Research, 1967
- 58 H.I. Peterson and L. Zettergren: Thromboplastic and fibrinolytic properties of three transplantable rat tumours
Acta chir. scand. 136, 365-368, 1970
- 59 E. Reich: Tumour associated fibrinolysis
Federation Proceedings, Vol 32, No 12, 2174-75, 1973
- 60 A. Retic, M. Arons, A. Ketcham, N. Mantel: The effect of heparin on primary tumours and metastases
J. Surg. Res. 2: 49-51, 1962

- 61 J. Ries, H. Ludwig, W. Appel: Anticoagulantien bei der Strahlenbehandlung weiblicher Genitalcarcinome
Med. Welt 19, 2042-2047, 1968
- 62 D. Rifkin, J. Loeb, G. Moore, E. Reich: Properties of plasminogen activators formed by neoplastic human cell cultures
J. Exp. Med. 139, 1317, 1974
- 63 B. Risberg, H.I. Peterson, L. Zettergren: Fibrinolysis of the lung: An experimental study on the localization of plasminogen activator in the rat lung
Microvasc. Research 9, 222-229, 1975
- 64 J.T. Roberts: Localisation of plasminogen activator in neonatal lung in the presence of hyaline membrane disease
J. Clin. Pathol. 18, 586
- 65 C.M. Rudenstam: Effect of fibrinolytic and anti-fibrinolytic therapy on the dissemination of experimental tumours
Bibl. Anat. 9, 418, 1967
- 66 C.M. Rudenstam: Effect of fibrinolytic, antifibrinolytic and flow promoting agents on metastases formation and tumour growth. In: Endogenous factors influencing host-tumour balance, pp 277-298, University of Chicago Press 1967
- 67 J.J. Ryan: Warfarin treatment of mice bearing autochthonous tumours: Effect on spontaneous metastases
Science 162, 1493-1494, 1968

- 68 F. Schmidt, H. Albers: Über den Fibringehalt
des Plasmas von Tumor- und Normalratten
Acta biol. med. germ. B. 11, 134-140, 1963
- 69 H. G. Schwick, N. Heimbürger: Zur Biochemie der
Fibrinolyse
Thrombosis, Vol 32
- 70 K. Suemasu, S. Ishikawa: Inhibitive effect of heparin
and dextrane sulfate on experimental pulmonary
metastases
Gann 61: 125,130, 1970
- 71 L. Svanberg, B. Astedt: Coagulative and fibrinolytic
properties of ascitic fluid associated with ovarian
tumours
Cancer 35: 1382-1387, 1975
- 72 L. Svanberg, B. Astedt: Release of fibrinolytic
activators from human ovarian tumours in organ culture
Annales Chir. et Gynaec. 65: 405-407, 1976
- 73 L. Svanberg, F. Linell, M. Pandolfi, B. Astedt:
Plasminogen activators in ovarian tumours
Acta path. et microbiol. scand. A 83, 193-198, 1975
- 74 R.D. Thornes & W.T. Martin: The cytopathic effect of
fibrinolytic agents and human placental fractions on
HeLa cells
Irish. J. med. Sci. 431, p. 487, 1961
- 75 S. Wood, J. Yardley, E. Holyoke: The relationship
between intravascular coagulation and the formation of
pulmonary metastases in mice injected intravenously
with tumour suspensions
Pro. Amer. Ass. Cancer Res. 2: 260 - 264, 1957

Lebenslauf

Am 26. Juli 1952 wurde ich als 2. Kind des Kraftfahrzeugmeisters Hans Rupprecht und seiner Ehefrau Rosa Rupprecht in Ebermannstadt geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1958 - 1961 in Ebermannstadt, von 1961 - 1966 in München. Danach absolvierte ich eine Ausbildung als Beamtenanwärter im mittleren Dienst der bayerischen Finanzverwaltung, die ich 1970 mit der Ernennung zum Regierungssistenten abschloss. Mit Ablauf des Jahres 1971 kündigte ich das Beamtenverhältnis, um im Februar 1972 in das Münchenkolleg - einem Institut zur Erlangung der Hochschulreife - einzutreten. Während der Zeit am Münchenkolleg schloß ich 1973 die Ehe mit Irene Fink. Unser erstes Kind wurde 1974, unser zweites Kind 1978 geboren. Im Juni 1974 erwarb ich am Münchenkolleg die Hochschulreife.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich das Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität zu München. Die ärztliche Vorprüfung legte ich nach dem Sommersemester 1976, das 1. medizinische Staatsexamen nach dem Sommersemester 1977 und das 2. medizinische Staatsexamen nach dem Wintersemester 1979/80 ab. Den dritten Teil des medizinischen Staatsexamens habe ich schriftlich am 7. April 1981 und mündlich am 28. April 1981 mit Erfolg abgelegt.

